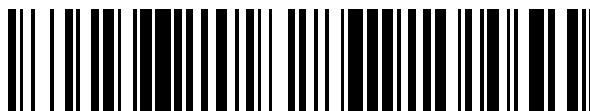


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 098**

51 Int. Cl.:

A61K 31/495 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2014** **PCT/GB2014/050833**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014** **WO14140647**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2014** **E 14712716 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2018** **EP 2968312**

54 Título: **Combinación de fármacos**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361799177 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.05.2018

73 Titular/es:

VERONA PHARMA PLC (100.0%)
Bradley Court
Park PlaceCardiffCF10 3DR, GB

72 Inventor/es:

WALKER, MICHAEL J. A.;
CAZZOLA, MARIO y
CALZETTA, LUIGINO

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 666 098 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Combinación de fármacos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una nueva combinación de fármacos que tiene una eficacia terapéutica sorprendente en el tratamiento de trastornos respiratorios e inflamatorios.

10 Antecedentes de la invención

Existe una serie de diferentes enfoques terapéuticos para el tratamiento de enfermedades respiratorias tales como el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Por ejemplo, corticoesteroides, agonistas del receptor adrenérgico β_2 , inhibidores de la fosfodiesterasa (PDE) 4, inhibidores de la PDE 3, antagonistas del receptor de leucotrienos, inhibidores de la quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (egfr), inhibidores de la quinasa p38, agonistas de NK1 y antagonistas de receptores muscarínicos son todos conocidos para su uso en el tratamiento de enfermedades respiratorias.

RPL554 (9,10-Dimetoxi-2-(2,4,6-trimetilfenilimino)-3-(N-carbamoil-2-aminoetil)-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[6,1-a]isoquinolin-4-ona) es un inhibidor dual de PDE3/PDE4 y se describe en el documento WO 00/58308. Como inhibidor combinado de PDE3/PDE4, RPL554 tiene actividad tanto antiinflamatoria como broncodilatadora y es útil en el tratamiento de trastornos respiratorios tales como el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

Se sabe que pueden usarse diferentes clases de fármacos respiratorios en combinación para el tratamiento de enfermedades respiratorias. Sin embargo, raramente se observa interacción sinérgica entre los componentes de dichas combinaciones.

Sumario de la invención

Es un descubrimiento sorprendente de la presente invención que RPL554 es capaz de potenciar la actividad de los agonistas del receptor adrenérgico β_2 . Por tanto, RPL554 y los agonistas del receptor adrenérgico β_2 interactúan sinérgicamente en combinación para proporcionar un efecto terapéutico mejorado.

Las interacciones verdaderamente sinérgicas entre fármacos son raras. La presencia de una interacción sinérgica puede determinarse mediante, por ejemplo, el método Berenbaum, el criterio de Independencia de Bliss (IB) y/o el modelo de aditividad de Loewe (AL) a través de isobolos curvados (véase Berenbaum, 1977; Greco et al., 1995; Grabovsky y Tallarida, 2004; Tallarida, 2006; Goldoni y Johansson, 2007; Tallarida y Raffa, 2010).

De acuerdo con el método de Berenbaum, la sinergia para una combinación se detecta determinando primero curvas de dosis-respuesta para cada uno de los fármacos constituyentes como monoterapias con el fin de identificar una dosis baja y alta de cada fármaco. Después, se mide el efecto de una combinación de las dosis bajas de cada fármaco. Si una combinación de las dosis bajas de cada fármaco produce una respuesta mayor que cualquier dosis alta sola como monoterapia, entonces existe sinergia verdadera entre los dos fármacos.

Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que surge un verdadero efecto sinérgico de acuerdo con el método Berenbaum cuando se combina RPL554 con un agonista del receptor adrenérgico β_2 . El efecto terapéutico potenciado que se obtiene durante el uso de dosis bajas de cada fármaco constituyente es altamente deseable en un contexto clínico y, por ejemplo, reduce los efectos secundarios experimentados por el paciente.

En consecuencia, la presente invención proporciona una composición que comprende (a) un inhibidor de PDE3/PDE4 que es 9,10-Dimetoxi-2-(2,4,6-trimetilfenilimino)-3-(N-carbamoil-2-aminoetil)-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[6,1a]isoquinolin-4-ona o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de la misma y (b) un agonista del receptor adrenérgico β_2 que es salbutamol, albuterol, bitolterol, fenoterol, formoterol, isoetarina, levalbuterol, metaproterenol, pirbuterol, salmefamol, salmeterol o terbutalina, cuya composición es para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección que es asma, asma alérgica, fiebre del heno, rinitis alérgica, bronquitis, enfisema, bronquiectasia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA), asma resistente a esteroides, asma severa, asma pediátrica, fibrosis quística, fibrosis de los pulmones, fibrosis pulmonar, enfermedad pulmonar intersticial, trastornos de la piel, dermatitis atópica, psoriasis, inflamación ocular, isquemia cerebral o una enfermedad autoinmunitaria.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una composición como se describe en el presente documento y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección como se define en el presente documento.

La invención también proporciona un producto que comprende (a) un inhibidor/PDE4 PDE3 como se define en el presente documento y (b) un agonista del receptor adrenérgico β_2 para su uso simultáneo, por separado o secuencial en el tratamiento de una enfermedad o afección como se define en el presente documento.

- 5 La invención también proporciona un inhibidor de PDE3/PDE4 como se define en el presente documento para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección como se define en el presente documento en combinación con un agonista del receptor adrenérgico β_2 .

- 10 La invención también proporciona un agonista del receptor adrenérgico β_2 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección como se define en el presente documento en combinación con un inhibidor de PDE3/PDE4 como se define en el presente documento.

Breve descripción de las figuras

- 15 **Figura 1:** Gráfico de líneas que representa la inhibición de la contracción de preparaciones bronquiales aisladas humanas por ECM después de 50 min de incubación con RPL554. Los puntos mostrados son de experimentos realizados con muestras de sujetos diferentes $n = 5$ y se representan como la media $\pm$ ETM; *** $P < 0,001$ frente a control.

- 20 **Figura 2:** Relajación bronquial humana de RPL554 y salbutamol sobre la contracción submáxima por acetilcolina. Los puntos mostrados son de experimentos realizados con muestras de sujetos diferentes $n = 5$ y se representan como la media $\pm$ ETM; *** $P < 0,001$ frente a salbutamol.

- 25 **Figura 3:** Efecto del aumento de la dosis de RPL554 sobre el efecto contráctil de la histamina en bronquios aislados humanos sensibilizados pasivamente. Los puntos mostrados son de experimentos realizados con muestras de sujetos diferentes $n = 5$ y se representan como la media $\pm$ ETM *** $P < 0,001$ frente a control sensibilizado pasivamente.

- 30 **Figura 4:** Interacción de bajas concentraciones (10 nM y 100 nM) entre salbutamol y RPL554. Los datos son de experimentos realizados con muestras de sujetos diferentes $n = 5$ y se representan como la media $\pm$ ETM. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$.

- 35 **Figura 5:** Superficies de interacción obtenidas del análisis de superficie de respuesta del modelo de interacción de fármacos por IB para la combinación de RPL554 más salbutamol. El eje horizontal indica la concentración de compuestos y el eje vertical representan la ΔE (relajación, %). El plano 0 indica interacciones por IB mientras que el volumen por encima del plano 0 representa interacciones sinérgicas (ΔE positiva). La magnitud de las interacciones está directamente relacionada con la ΔE y los diferentes tonos en los gráficos 3D representan diferentes bandas de percentil de sinergia (10 %). Cada punto de intersección representa la media de experimentos realizados en muestras de diferentes sujetos ($n = 5$).

- 40 **Figura 6:** Gráfico de barras que representa la respuesta de relajación al salbutamol (columna abierta; SALB, nM), RPL554 (columna cerrada; nM) la respuesta aditiva de cada combinación de dosis (columna punteada; Aditiva) y la respuesta de relajación observada para cada combinación de dosis (columna punteada oscura; Combinación 1:1)). Las concentraciones de cada agonista se muestran en el eje X. Cada barra representa la media y las líneas verticales representan la desviación normal ($N = 5$). En el caso de la respuesta aditiva, la DT se estimó usando los métodos de Tallarida y Raffa (2010). * $P < 0,005$ (ajustado) de respuesta aditiva usando un ensayo t de una sola muestra.

- 45 **Figura 7:** Reducción en la obstrucción de las vías respiratorias (inducida por la administración intravenosa (iv.) de bombesina (2 $\mu\text{g/ml}$; 5 ml/h)) después de la administración iv. de RPL554 solo (●) o en combinación con salbutamol 2 $\mu\text{g/kg}$ (■).

- 50 **Figura 8:** Reducción en la presión arterial media después de la administración iv. de RPL554 solo (●) o en combinación con salbutamol 2 $\mu\text{g/kg}$ (■).

- 55 **Figura 9:** Reducción en la obstrucción de las vías respiratorias (inducida por la administración intravenosa (iv.) de bombesina (2 $\mu\text{g/ml}$; 5 ml/h)) después de la administración iv. de salbutamol.

- 60 **Figura 10:** Reducción de la presión arterial media tras la administración iv. de salbutamol.

Descripción detallada de la invención

Se usan las siguientes abreviaturas en el presente documento:

- 65 RPL554: 9,10-Dimetoxi-2-(2,4,6-trimetilfenilimino)-3-(N-carbamoyl-2-aminoetil)-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirido[6,1-a]isoquinolin-4-ona; ANOVA: análisis de la varianza; IB: Independencia de Bliss; COX: ciclooxigenasa; EC30:

concentración requerida para provocar un efecto máximo del 30 %; CE50: concentración requerida para provocar un efecto máximo del 50 %; CE70: concentración requerida para provocar un efecto máximo del 70 %; ECM: estimulación por campo eléctrico; Emax: efecto máximo; KH: solución tampón de Krebs-Henseleit; AL: aditividad de Loewe; y PDE: fosfodiesterasa.

5 La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material que no es indeseable biológicamente o de otra manera. Por ejemplo, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material que puede incorporarse en una composición y administrarse a un sujeto/paciente sin provocar efectos biológicos indeseables o interactuar de manera perjudicial con otros componentes de la composición. Dichos materiales farmacéuticamente
10 aceptables normalmente han satisfecho los criterios requeridos de ensayo toxicológico y de fabricación, e incluyen aquellos materiales identificados como ingredientes inactivos adecuados por la Administración de Alimentos y Fármacos de los EE.UU.

15 La expresión "sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal de adición de ácido de un producto farmacéutico que no es indeseable biológicamente o de otra manera. Dichas sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables son bien conocidas por el experto.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad suficiente para efectuar el tratamiento cuando se administra a un sujeto que necesita tratamiento. En particular, una cantidad "eficaz" es aquella cantidad necesaria
20 para obtener el resultado deseado y una cantidad "terapéuticamente eficaz" es aquella cantidad necesaria para obtener el efecto terapéutico deseado. Por ejemplo, para actuar como agonista de un receptor adrenérgico β_2 , una "cantidad eficaz" es una cantidad que actúa como agonista de un receptor adrenérgico β_2 . De forma similar, una cantidad terapéuticamente eficaz para tratar la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es aquella cantidad que conseguirá el resultado terapéutico deseado, que puede ser la prevención, la mejora, la supresión o el
25 alivio de la enfermedad.

El término "tratar" o "tratamiento" como se usa en el presente documento significa tratar o el tratamiento de una enfermedad o afección médica (tal como COPD) en un sujeto, tal como un mamífero (en particular un ser humano) que incluye: (a) evitar que se produzca la enfermedad o afección médica, es decir, el tratamiento profiláctico de un
30 sujeto; (b) mejorar la enfermedad o afección médica, es decir, eliminar o provocar la regresión de la enfermedad o afección médica en un sujeto; (c) suprimir la enfermedad o afección médica, es decir, ralentizar o detener el desarrollo de la enfermedad o afección médica en un sujeto; o (d) aliviar los síntomas de la enfermedad o afección médica en un sujeto. Por ejemplo, la expresión "tratar la EPOC" incluiría evitar que se produzca la EPOC, mejorar la EPOC, suprimir la EPOC y aliviar los síntomas de la EPOC. El término "sujeto" pretende incluir aquellos animales,
35 tales como seres humanos, que necesitan tratamiento o prevención de enfermedades, que actualmente están siendo tratados para la prevención de una enfermedad o el tratamiento de una enfermedad específica o una afección médica, así como sujetos de ensayo en los que las composiciones de la invención se están evaluando o se están usando en un ensayo, por ejemplo, un modelo animal.

40 *El inhibidor de PDE3/PDE4*

El inhibidor de PDE3/PDE4 utilizado en la presente invención es 9,10-dimetoxi-2-(2,4,6-trimetilfenilimino)-3-(N-carbamoyl-2-aminoetil)-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirimido[6,1-a]isoquinolin-4-ona (también conocida como RPL554) o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de la misma.

45 Normalmente, el inhibidor de PDE3/PDE4 es 9,10-dimetoxi-2-(2,4,6-trimetilfenilimino)-3-(N-carbamoyl-2-aminoetil)-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirimido[6,1-a]isoquinolin-4-ona. Por tanto, se prefiere la base libre de 9,10-dimetoxi-2-(2,4,6-trimetilfenilimino)-3-(N-carbamoyl-2-aminoetil)-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirimido[6,1-a]isoquinolin-4-ona.

50 *Agonista del receptor adrenérgico β_2*

Un agonista del receptor adrenérgico β_2 es un compuesto que actúa sobre receptores adrenérgicos β_2 , lo que provoca la relajación del músculo liso. Un experto puede determinar si un compuesto dado es un agonista del receptor adrenérgico β_2 sin dificultad usando ensayos bien conocidos por los expertos en la materia.

55 Se sabe bien que los agonistas del receptor adrenérgico β_2 actúan de forma similar como una clase de fármacos a pesar de las diferencias estructurales entre los compuestos de esta clase. Es un hallazgo de la presente invención que RPL554 es capaz de potenciar la actividad del salbutamol. En vista del comportamiento similar de todos los miembros de la clase de fármacos receptores adrenérgicos β_2 , se deduce que se puede esperar una interacción
60 sinérgica con RPL554 para todos los compuestos con actividad agonista del receptor adrenérgico β_2 .

Normalmente, el agonista del receptor adrenérgico β_2 se administra en una cantidad suficiente para proporcionar aproximadamente 0,05-500 μg por dosis.

65 El agonista del receptor adrenérgico β_2 es salbutamol, albuterol, bitolterol, fenoterol, formoterol, isoetarina, levalbuterol, metaproterenol, pirbuterol, salmefamol, salmeterol o terbutalina.

Preferentemente, el agonista del receptor adrenérgico β_2 es salbutamol, salmeterol, formoterol, albuterol o pirbuterol.

Más preferentemente, el agonista del receptor adrenérgico β_2 es salbutamol.

- 5 Los agonistas del receptor adrenérgico β_2 están opcionalmente en forma de sus racematos, sus enantiómeros, sus diastereoisómeros y mezclas de los mismos, y opcionalmente sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables. Son ejemplos normales de ácidos adecuados para la formación de sales de adición de los agonistas del receptor adrenérgico β_2 ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido acético, ácido fumárico, ácido succínico, ácido maleico y ácido trifluoroacético. Además, pueden usarse
10 mezclas de las sales mencionadas anteriormente.

Composiciones, combinaciones, composiciones farmacéuticas y formulaciones

- 15 Las composiciones para su uso de acuerdo con la invención comprenden (a) un inhibidor de PDE3/PDE4 que es 9,10-dimetoxi-2-(2,4,6-trimetilfenilimino)-3-(N-carbamoil-2-aminoetil)-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirimido[6,1-a]isoquinolin-4-ona o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de la misma y (b) un agonista del receptor adrenérgico β_2 .

- 20 Normalmente, la composición es una combinación fija. En una combinación fija, el inhibidor de PDE3/PDE4 y el agonista del receptor adrenérgico β_2 están presentes en la misma composición. La combinación fija puede usarse para la administración simultánea del inhibidor de PDE3/PDE4 y el agonista del receptor adrenérgico β_2 . Normalmente, la combinación fija es una composición de polvo seco (que es preferentemente adecuada para la entrega de un inhalador de polvo seco), una solución que es adecuada para la entrega de un nebulizador, o una solución o suspensión que es adecuada para la entrega desde un inhalador presurizado de dosis dosificada.

- 25 Por tanto, por ejemplo, la combinación fija es preferentemente una composición de polvo seco que comprende tanto el inhibidor de PDE3/PDE4 y el agonista del receptor adrenérgico β_2 . Como alternativa, la combinación fija puede ser una solución, por lo general una solución acuosa, que comprenda tanto el inhibidor de PDE3/PDE4 y el agonista del receptor adrenérgico β_2 , que sea adecuada para la entrega de un nebulizador. Como alternativa, la combinación
30 fija puede ser una solución o suspensión que comprenda tanto el inhibidor de PDE3/PDE4 como el agonista del receptor adrenérgico β_2 , que sea adecuada para la entrega desde un inhalador presurizado de dosis dosificada.

Los dos componentes en una combinación fija normalmente están entremezclados.

- 35 Como alternativa, la composición puede ser una combinación libre. En una combinación libre, los componentes activos (a) y (b) normalmente se separan el uno del otro y se envasan en una unidad para la administración simultánea, sustancialmente simultánea, por separado o secuencial.

- 40 Normalmente, la composición es una composición farmacéutica que comprende adicionalmente uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables además del inhibidor de PDE3/PDE4 y el agonista del receptor adrenérgico β_2 . Las composiciones pueden contener otros agentes terapéuticos y/o de formulación si se desea. Un ejemplo preferido de otro agente terapéutico es un antagonista de receptores muscarínicos. Los ejemplos de antagonistas de receptores muscarínicos incluyen atropina, hioscina, glicopirrolato (glicopirronio), ipratropio, tiotropio, oxitropio, pirenzepina, telenzepina, aclidinio y umeclidinio. Los ejemplos preferidos de antagonistas de
45 receptores muscarínicos incluyen atropina, glicopirronio, bromuro de ipratropio o bromuro de tiotropio.

- Las composiciones se administran normalmente a un sujeto en forma de una composición farmacéutica. Dichas composiciones farmacéuticas pueden administrarse al sujeto por cualquier vía de administración aceptable incluyendo, pero no limitada a, modos de administración inhalada, oral, nasal, tópica (incluyendo transdérmica) y parenteral. Se prefiere la administración por inhalación. Adicionalmente, las composiciones pueden administrarse,
50 por ejemplo, por vía oral, en dosis múltiples por día, en una única dosis diaria o una única dosis semanal. Se entenderá que puede usarse cualquier forma de los agentes activos utilizados en la composición de la invención, (es decir, una base libre, una sal farmacéuticamente aceptable, un solvato, etc.) que sea adecuada para el modo particular de administración en las composiciones farmacéuticas analizadas en el presente documento.

- 55 Las composiciones farmacéuticas contienen normalmente una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente activo. Los expertos en la materia reconocerán, sin embargo, que una composición farmacéutica puede contener más de una cantidad terapéuticamente eficaz, es decir, composiciones a granel, o menos de una cantidad terapéuticamente eficaz, es decir, dosis unitarias individuales diseñadas para la administración múltiple para conseguir una cantidad
60 terapéuticamente eficaz. En una realización, la composición contendrá aproximadamente el 0,01-95 % en peso de agente activo, incluyendo, aproximadamente el 0,01-30 % en peso, tal como aproximadamente el 0,01-10 % en peso, dependiendo la cantidad real de la formulación en sí misma, de la vía de administración, de la frecuencia de dosificación, etc. En otra realización, una composición adecuada para la inhalación, por ejemplo, comprende aproximadamente el 0,01-30 % en peso de agente activo, otra realización más comprende aproximadamente el
65 0,01-10 % en peso de agente activo.

Puede usarse cualquier vehículo o excipiente convencional en la composición farmacéutica. La elección de un vehículo o excipiente particular, o combinaciones de vehículos o excipientes, dependerá del modo de administración que se use para tratar un sujeto particular o tipo de afección médica o patología. En este sentido, la preparación de una composición adecuada para un modo particular de administración está bien dentro del alcance de los expertos en las técnicas farmacéuticas. Adicionalmente, hay disponibles en el mercado vehículos o excipientes utilizados en dichas composiciones. A modo de ilustración adicional, se describen técnicas de formulación convencionales en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª edición, Lippincott Williams & White, Baltimore, MD (2000); y H. C. Ansel et al., *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 7ª edición, Lippincott Williams & White, Baltimore, Md. (1999).

Los ejemplos representativos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa, tal como celulosa microcristalina y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua apirógena; solución salina isotónica; Solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones de tampón fosfato; gases propulsores comprimidos, tales como clorofluorocarbonos e hidrofluorocarbonos; y otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas normalmente se preparan mezclando o combinando homogénea e íntimamente el agente activo/ingrediente activo con un vehículo farmacéuticamente aceptable y uno o más ingredientes opcionales. La mezcla uniformemente mezclada resultante después puede conformarse o cargarse en comprimidos, cápsulas, cartuchos, botes, cartuchos, dosificadores y similares usando procedimientos y equipos convencionales.

Normalmente, las composiciones farmacéuticas son adecuadas para la administración inhalada. La composición farmacéutica puede ser para la administración mediante un inhalador de polvo seco (IPS) o un inhalador de dosis dosificada (IDD).

Las composiciones adecuadas para la administración inhalada estarán normalmente en forma de un aerosol o un polvo, por ejemplo, una composición de polvo seco. Dichas composiciones se administran generalmente usando dispositivos de entrega bien conocidos, tales como un inhalador nebulizador, un inhalador de polvo seco o un inhalador de dosis dosificada, ejemplos de los cuales se describen a continuación.

Como alternativa, una composición que comprende el agente activo o agentes activos/principio activo o principios activos puede administrarse por inhalación usando un inhalador nebulizador. Dichos dispositivos nebulizadores producen normalmente una corriente de aire a alta velocidad que hace que la composición se pulverice como una niebla que se lleva al tracto respiratorio de un sujeto. En consecuencia, cuando se formulan para su uso en un inhalador nebulizador, el agente activo o agentes activos/principio activo o principios activos se disuelven normalmente en un vehículo adecuado para formar una solución. Como alternativa, el agente activo o agentes activos/principio activo o principios activos pueden micronizarse y combinarse con un vehículo adecuado para formar una suspensión de partículas micronizadas de tamaño respirable, donde micronizado normalmente se define como que tiene partículas en las que al menos aproximadamente el 90 por ciento de las partículas tienen una mediana del diámetro en masa de menos de aproximadamente 10 µm. La expresión "mediana del diámetro en masa" significa el diámetro de manera que la mitad de la masa de las partículas esté contenida en partículas con un diámetro mayor y la mitad esté contenida en partículas con un diámetro más pequeño.

Los dispositivos nebulizadores adecuados incluyen el Inhalador Respimat^{RTM} Soft MistTM (Boehringer Ingelheim), el Sistema de Entrega Pulmonar AERx^{RTM} (Aradigm Corp.) y el nebulizador reutilizable PARI LC Plus (Pari GmbH). Una composición ejemplar para su uso en un inhalador nebulizador comprende una solución acuosa isotónica que comprende de aproximadamente 0,05 µg/ml a aproximadamente 10 µg/ml de un RPL554. En una realización, una solución de este tipo tiene un pH de aproximadamente 3,5-6.

Como alternativa, una composición que comprende el agente activo o agentes activos/principio activo o principios activos puede administrarse por inhalación usando un inhalador de polvo seco (IPS). Dichos IPS normalmente administran el agente activo como un polvo fluido que se dispersa en la corriente de aire de un sujeto durante la inspiración. Con el fin de conseguir un polvo fluido, el agente activo o agentes activos/principio activo o principios activos normalmente se formulan con un excipiente adecuado tal como lactosa, almidón, manitol, dextrosa, ácido poliláctico, polilactida-co-glicólido y combinaciones de los mismos. Normalmente, el agente activo o agentes activos/principio activo o principios activos se micronizan y se combinan con un excipiente para formar una mezcla adecuada para la inhalación. En consecuencia, en una realización de la invención, el agente activo o agentes activos/principio activo o principios activos están en forma micronizada. Por ejemplo, una composición representativa para su uso en un IPS comprende lactosa seca que tiene un tamaño de partícula de entre aproximadamente 1 µm y aproximadamente 100 µm (por ejemplo, lactosa molida en seco) y partículas micronizadas del agente activo. Una formulación de polvo seco de este tipo puede fabricarse, por ejemplo, combinando lactosa con el agente activo y

después mezclando en seco los componentes. Como alternativa, si se desea, el agente activo puede formularse sin un excipiente. Normalmente, la composición después se carga en un IPS o en cartuchos de inhalación o cápsulas para su uso con un IPS. Los inhaladores de polvo seco son bien conocidos por los expertos habituales en la materia y muchos de dichos dispositivos están disponibles en el mercado, con dispositivos representativos incluyendo Aerolizer^{RTM} (Novartis), AirmaxTM (IVAX), ClickHaler^{RTM} (Innovata Biomed), Diskhaler^{RTM} (GlaxoSmithKline), Diskus^{RTM} o Accuhaler (GlaxoSmithKline), Easyhaler^{RTM} (Orion Pharma), EclipseTM (Aventis), FlowCaps^{RTM} (Hovione), Handihaler^{RTM} (Boehringer Ingelheim), Pulvinal^{RTM} (Chiesi), Rotahaler^{RTM} (GlaxoSmithKline), SkyeHalerTM o CertihalerTM (SkyePharma), Twisthaler (Schering-Plough), Turbuhaler^{RTM} (AstraZeneca), Ultrahaler^{RTM} (Aventis) y similares.

Como alternativa, la composición que comprende el agente activo puede administrarse por inhalación usando un inhalador de dosis dosificada (IDD). Dichos IDD normalmente descargan una cantidad medida del agente activo usando un gas propulsor comprimido. Por tanto, las formulaciones de dosis dosificadas comprenden normalmente una solución o suspensión del agente activo en un propulsor licuado, tal como un clorofluorocarbono tal como CCl₃F o un hidrofluoroalcano (HFA) tal como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134a) y 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoro-n-propano (HFA 227) aunque generalmente se prefieren los HFA debido a las preocupaciones acerca de que los clorofluorocarbonos afectan a la capa de ozono. Los componentes de HFA opcionales adicionales incluyen cosolventes tales como etanol o pentano, y tensioactivos, tales como trioleato de sorbitano, ácido oleico, lecitina y glicerina. Véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. N.º 5.225.183 de Purewal et al., el documento EP 0717987 A2 (Minnesota Mining and Manufacturing Company) y el documento WO 92/22286 (Minnesota Mining and Manufacturing Company). Una composición representativa para su uso en un IDD comprende de aproximadamente el 0,01 al 5 % en peso de agente activo; de aproximadamente el 0 al 20 % en peso de etanol; y de aproximadamente el 0 al 5 % en peso de tensioactivo; siendo el resto un propulsor de HFA. Dichas composiciones normalmente se preparan añadiendo hidrofluoroalcano enfriado o presurizado a un recipiente adecuado que contiene el agente activo, etanol (si está presente) y el tensioactivo (si está presente). Para preparar una suspensión, el agente activo se microniza y después se combina con el propulsor. La formulación después se carga en un bote de aerosol, que forma una porción del IDD. Los IDD son bien conocidos para los expertos habituales en la materia, y muchos de dichos dispositivos están disponibles en el mercado, incluyendo los dispositivos representativos Sistema Inhalador AeroBid (Forest Pharmaceuticals), Aerosol de Inhalación Atrovent (Boehringer Ingelheim), Flovent^{RTM} (GlaxoSmithKline), Inhalador Maxair (3M), Inhalador Proventil^{RTM} (Schering), Aerosol de Inhalación Serevent^{RTM} (GlaxoSmithKline) y similares. Como alternativa, puede prepararse una formulación en suspensión secando por pulverización un recubrimiento de tensioactivo sobre partículas micronizadas del agente activo. Véase, por ejemplo, el documento WO 99/53901 (Glaxo Group Ltd.) y el documento WO 00/61108 (Glaxo Group Ltd.).

Los ejemplos adicionales de procesos de preparación de partículas respirables y formulaciones y dispositivos adecuados para la dosificación de inhalación se describen en las Patentes de los EE.UU. N.º 5.874.063 de Briggner et al.; 5.983.956 de Trofast; 6.221.398 de Jakupovic et al.; 6.268.533 de Gao et al.; 6.475.524 de Bisrat et al.; y 6.613.307 de Cooper.

Como alternativa, las composiciones farmacéuticas pueden ser adecuadas para la administración por vía oral. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración por vía oral pueden estar en forma de cápsulas, comprimidos, píldoras, pastillas para chupar, sellos, grageas, polvos, gránulos; soluciones o suspensiones en un líquido acuoso o no acuoso; emulsiones líquidas de aceite en agua o de agua en aceite; elixires o jarabes; y similares; conteniendo, cada una, una cantidad predeterminada del agente activo.

Cuando tiene por objeto la administración por vía oral en una forma de dosificación sólida (es decir, en forma de cápsulas, comprimidos, píldoras y similares), la composición normalmente comprenderá el agente activo y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato de dicalcio. Las formas de dosificación sólidas también pueden comprender: cargas o diluyentes tales como almidones, celulosa microcristalina, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; aglutinantes tales como carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábiga; humectantes tales como glicerol; agentes disgregantes tales como agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o de tapioca, ácido alginico, ciertos silicatos y/o carbonato sódico; agentes retardantes de la solución tales como parafina; aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario; agentes humectantes tales como alcohol cetílico y/o monoestearato de glicerol; absorbentes tales como caolín y/o arcilla de bentonita; lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y/o mezclas de los mismos; agentes colorantes; y agentes tamponantes.

También pueden estar presentes en las composiciones farmacéuticas agentes de liberación, agentes humectantes, agentes de recubrimiento, edulcorantes, aromatizantes y agentes perfumantes, conservantes y antioxidantes. Los agentes de recubrimiento de ejemplo para comprimidos, cápsulas, píldoras y similares incluyen aquellos utilizados para recubrimientos entéricos, tales como ftalato de acetato de celulosa, ftalato de acetato de polivinilo, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, copolímeros de ácido metacrílico-éster de ácido metacrílico, trimelitato de acetato de celulosa, carboximetil etil celulosa, succinato de acetato de hidroxipropil metil celulosa, y similares. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: antioxidantes solubles en agua tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfato de sodio, sulfito de sodio y similares; antioxidantes solubles

en aceite tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y agentes quelantes de metales tales como ácido cítrico, ácido etilendiamina tetraacético, sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

- 5 Las composiciones también pueden formularse para proporcionar la liberación lenta o controlada del agente activo usando, a modo de ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables u otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas. Además, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden contener agentes opacificantes y pueden formularse de manera que liberen el agente activo solamente, o preferentemente, en cierta porción del tracto gastrointestinal, opcionalmente, de una manera retardada. Los ejemplos de composiciones de
- 10 inclusión que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. El agente activo también puede estar en forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes descritos anteriormente. Las formas de dosificación líquidas adecuadas para la administración por vía oral incluyen, a modo de ilustración, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Las formas de dosificación líquidas normalmente comprenden el agente activo y un diluyente inerte tal como, por ejemplo, agua u
- 15 otros disolventes, solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (por ejemplo, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofúrico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano, y mezclas de los mismos. Las suspensiones pueden contener agentes de suspensión tales como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol y
- 20 ésteres de sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

Cuando tienen por objeto la administración por vía oral, las composiciones farmacéuticas pueden envasarse en una forma de dosificación unitaria. La expresión "forma de dosificación unitaria" se refiere a una unidad físicamente

25 individual adecuada para la dosificación a un sujeto, es decir, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de los agentes activos, calculada para producir el efecto terapéutico deseado ya sea solo o en combinación con uno o más unidades adicionales. Por ejemplo, dichas formas de dosificación unitaria pueden ser cápsulas, comprimidos, píldoras y similares.

- 30 Las composiciones también pueden administrarse por vía parenteral (por ejemplo, por inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular o intraperitoneal). Para dicha administración, los agentes activos se proporcionan en una solución, suspensión o emulsión estéril. Los ejemplos de disolventes para la preparación de dichas formulaciones incluyen agua, solución salina, alcoholes de bajo peso molecular tales como propilenglicol, polietilenglicol, aceites, gelatina, ésteres de ácidos grasos tales como oleato de etilo y similares. Una formulación parenteral normal es una
- 35 solución acuosa estéril de pH 4-7 de los agentes activos. Las formulaciones parenterales también pueden contener uno o más solubilizantes, estabilizantes, conservantes, agentes humectantes, emulsionantes y agentes dispersantes. Estas formulaciones pueden esterilizarse mediante el uso de un medio inyectable estéril, un agente de esterilización, filtración, irradiación o calor.

- 40 Las composiciones también pueden administrarse por vía transdérmica usando sistemas de entrega transdérmica y excipientes conocidos. Por ejemplo, los agentes activos pueden mezclarse con potenciadores de la penetración, tales como propilenglicol, monolaurato de polietilenglicol, azacicloalcan-2-onas y similares, y pueden incorporarse en un parche o sistema de entrega similar. Pueden usarse excipientes adicionales, incluyendo agentes gelificantes, emulsionantes y tampones, en dichas composiciones transdérmicas si se desea.

45 Mediante la combinación de RPL554 con un agente secundario, puede conseguirse una terapia doble, es decir, actividad de inhibición de PDE3/PDE4 y actividad asociada al agente secundario (agonista del receptor adrenérgico β_2), en algunos casos mediante la administración de dos composiciones y, en algunos casos, mediante la administración de una única composición que contiene el agente activo y el agente secundario. En la terapia de

50 combinación, la cantidad de RPL554 que se administra, así como la cantidad de agentes secundarios, pueden inferior a la cantidad administrada normalmente en monoterapia.

Puede mezclarse físicamente RPL554 con el segundo agente activo (el agonista del receptor adrenérgico β_2) para formar una composición que contiene ambos agentes; o cada agente puede estar presente en composiciones

55 distintas y separadas que se administran al sujeto simultánea o secuencialmente. Por ejemplo, puede combinarse RPL554 con un segundo agente activo usando procedimientos y equipos convencionales para formar una combinación de agentes activos que comprenden RPL554 y un segundo agente activo. Adicionalmente, los agentes activos pueden combinarse con un vehículo farmacéuticamente aceptable para formar una composición farmacéutica que comprende RPL554, un segundo agente activo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En

60 esta realización, los componentes de la composición normalmente se combinan o mezclan para crear una mezcla física. La mezcla física después se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz usando cualquiera de las vías descritas en el presente documento.

Como alternativa, los agentes activos pueden permanecer separados y distintos antes de la administración al sujeto.

65 En esta realización, los agentes no se mezclan físicamente entre sí antes de la administración, pero se administran simultáneamente o en tiempos separados como composiciones separadas. Dichas composiciones pueden

envasarse por separado o pueden envasarse juntas en un kit. Cuando se administran en momentos separados, el agente secundario normalmente se administrará menos de 24 horas después de la administración de RPL554. En otras realizaciones esta relación temporizada es inferior a 12 horas, inferior a 8 horas, inferior a 6 horas, inferior a 4 horas, inferior a 3 horas, inferior a 1 hora, inferior a treinta minutos, inferior a diez minutos, inferior a un minuto o inmediatamente después de la administración de RPL554. Esto también se denomina administración secuencial. Por tanto, puede administrarse RPL554 por inhalación simultánea o secuencialmente con otro agente activo usando un dispositivo de entrega de inhalación que emplea compartimentos separados (por ejemplo, blísteres) para cada agente activo, donde secuencial puede significar administrarse inmediatamente después de la administración de RPL554 o en algún tiempo predeterminado posterior (por ejemplo, una hora más tarde o tres horas más tarde).

Como alternativa, la combinación puede administrarse usando dispositivos de entrega separados, es decir, un dispositivo de entrega para cada agente. Adicionalmente, los agentes pueden entregarse por vías de administración diferentes, es decir, uno por inhalación y el otro por administración por vía oral.

Normalmente, el kit comprende una primera forma de dosificación que comprende RPL554 y al menos una forma de dosificación adicional que comprende uno o más de los agentes secundarios que se establecen en el presente documento, en cantidades suficientes para realizar los métodos de la invención. La primera forma de dosificación y la segunda (o tercera, etc.) forma de dosificación comprenden juntas una cantidad terapéuticamente eficaz de agentes activos para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o afección médica en un sujeto. El agente secundario o agentes secundarios, cuando se incluyen, están presentes en una cantidad terapéuticamente eficaz, es decir, se administran normalmente en una cantidad que produce un efecto terapéuticamente beneficioso cuando se coadministran con RPL554. El agente secundario puede estar en forma de una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable, solvato, estereoisómero ópticamente puro, etc. Por tanto, los agentes secundarios que se enumeran a continuación tienen por objeto incluir todas dichas formas y están disponibles en el mercado o pueden prepararse usando procedimientos y reactivos convencionales. Las dosis adecuadas para un agente secundario están normalmente en el intervalo de aproximadamente 0,05 µg/día a aproximadamente 500 mg/día.

Enfermedades y afecciones

La combinación de (a) un inhibidor de PDE3/PDE4 como se define en el presente documento y (b) un agonista del receptor adrenérgico β_2 como se define en el presente documento es útil para tratar una enfermedad o afección que es asma, asma alérgica, fiebre del heno, rinitis alérgica, bronquitis, enfisema, bronquiectasia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA), asma resistente a esteroides, asma grave, asma pediátrica, fibrosis quística, fibrosis del pulmón, fibrosis pulmonar, enfermedad pulmonar intersticial, trastornos de la piel, dermatitis atópica, psoriasis, inflamación ocular, isquemia cerebral o una enfermedad autoinmunitaria.

Preferentemente, la enfermedad o afección es asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

El sujeto tratado es normalmente un ser humano.

Normalmente, los componentes activos (a) y (b) se coadministran. Preferentemente, los componentes activos (a) y (b) están contenidos en una única forma de dosificación.

Como alternativa, los componentes activos (a) y (b) pueden administrarse por separado. Puede haber un retardo temporal entre la administración de los componentes activos (a) y (b).

Los componentes activos (a) y (b) pueden administrarse por inhalación. Los componentes activos (a) y (b) pueden administrarse por aerosol.

La cantidad de agente activo administrada por dosis o la cantidad total administrada por día puede ser predeterminada o puede determinarse basándose en el paciente individual teniendo en cuenta numerosos factores, incluyendo la naturaleza y la gravedad de la afección del paciente, la afección que se trata, la edad, el peso y la salud general del paciente, la tolerancia del paciente al agente activo, la vía de administración, consideraciones farmacológicas tales como la actividad, eficacia, farmacocinética y perfiles toxicológicos del agente activo y cualquier agente secundario y similares. El tratamiento de un paciente que padece una enfermedad o afección médica (tal como la EPOC) puede comenzar con una dosificación predeterminada o una dosificación determinada por el médico y continuará durante un periodo de tiempo necesario para prevenir, mejorar, suprimir o aliviar los síntomas de la enfermedad o afección médica. Los pacientes sometidos a dicho tratamiento normalmente se controlarán habitualmente para determinar la eficacia del tratamiento. Por ejemplo, en el tratamiento de la EPOC, la mejora significativa en el volumen espiratorio forzado (medido en un segundo) puede usarse para determinar la eficacia del tratamiento. Indicadores similares para las otras enfermedades y afecciones que se describen en el presente documento, son bien conocidos para los expertos en la materia y están fácilmente disponibles para el médico. El control continuo por el médico garantizará que se administre la cantidad óptima de agente activo en cualquier momento dado, así como facilitará la determinación de la duración del tratamiento. Esto es de particular valor cuando también se administran agentes secundarios, ya que su selección, dosificación y duración de la terapia también pueden requerir un ajuste. De esta manera, la posología de tratamiento y la pauta de dosificación pueden

ajustarse en el transcurso de la terapia de manera que se administre la cantidad más baja de agente activo que presente la eficacia deseada y, adicionalmente, que la administración continúe solamente el tiempo que sea necesario para tratar satisfactoriamente la enfermedad o afección médica. Normalmente, las dosis adecuadas para el tratamiento de trastornos del músculo liso u otros trastornos mediados por receptores adrenérgicos β_2 variarán entre aproximadamente 0,14 $\mu\text{g/kg/día}$ a aproximadamente 7 mg/kg/día de agente activo; incluyendo de aproximadamente 0,15 $\mu\text{g/kg/día}$ a aproximadamente 5 mg/kg/día. Para un ser humano promedio de 70 kg, esto ascendería a aproximadamente 10 μg por día a aproximadamente 500 mg por día de agente activo.

Normalmente, las composiciones son útiles para tratar trastornos pulmonares o respiratorios, tales como EPOC o asma, en mamíferos, incluyendo seres humanos, mediante la administración a un paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición. Generalmente, la dosis para tratar un trastorno pulmonar variará de aproximadamente 10 a 1500 $\mu\text{g/día}$. Se entiende por los expertos habituales en la materia que el término "EPOC" incluye una diversidad de afecciones respiratorias, incluyendo bronquitis obstructiva crónica y enfisema, como se ejemplifica por el contenido de Barnes (2000) *N. Engl. J. Med.* 343: 269-78 y referencias citadas en el mismo.

Cuando se administran por inhalación, las composiciones tienen normalmente el efecto de producir broncodilatación. En consecuencia, también se describe un método de producción de broncodilatación en un paciente, que comprende administrar a un paciente una cantidad productora de broncodilatación de una composición de la invención. Generalmente, la dosis terapéuticamente eficaz para producir broncodilatación variará de aproximadamente 10 a 1500 $\mu\text{g/día}$.

Es un descubrimiento de la invención, después de estudios de seguridad, que RPL554 no interacciona adversamente con los agonistas del receptor adrenérgico β_2 (tales como salbutamol) con respecto a la presión arterial o el ritmo cardíaco. Análogamente, los efectos cardiovasculares de los agonistas del receptor adrenérgico β_2 (tales como salbutamol) no se ven afectados por RPL554.

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Material y Métodos

Preparación de tejidos

Se tomaron regiones de pulmones macroscópicamente normales de áreas no afectadas resecaadas de 24 sujetos (11 varones y 13 mujeres, de $60,1 \pm 1,6$ años) sometidos a una cirugía lobectomía para el cáncer de pulmón, pero sin antecedentes de enfermedad crónica de las vías respiratorias.

Las vías respiratorias se colocaron inmediatamente en solución oxigenada de tampón de Krebs-Henseleit (KH) (mM: NaCl 119,0, KCl 5,4, CaCl_2 2,5, KH_2PO_4 1,2, MgSO_4 1,2, NaHCO_3 25,0, glucosa 11,7; pH 7,4) que contiene el inhibidor de ciclooxigenasa (COX) indometacina (5,0 μM) y se transportaron a 4 °C desde el "Instituto Nacional de Cáncer Regina Elena" o el "Hospital Sant'Andrea" al Laboratorio de Investigación Respiratoria en la Facultad de Cirugía y Medicina de la "Universidad Tor Vergata", Roma, Italia. Ninguno de los sujetos fue tratado crónicamente con teofilina, agonistas β_2 o glucocorticoesteroides. Los niveles séricos de IgE determinados el día de la cirugía estaban en el intervalo normal. Los parámetros preoperatorios de la función pulmonar fueron en general normales y no hubo signos de infecciones respiratorias.

En el laboratorio, las vías respiratorias se disecaron a partir de tejidos conectivos y alveolares. Después, se aislaron y se almacenaron bronquios segmentarios durante la noche en solución tampón de KH a temperatura de refrigeración. A la mañana siguiente, los bronquios se cortaron en anillos ($n = 120$; espesor: 1-2 mm; diámetro: 5-7 mm) y se transfirieron a baños de órganos aislados de 10 ml de cuatro cámaras 4400 (Ugo Basile, VA - Italia) que contenían tampón KH (37 °C) y se airearon continuamente con una mezcla 95:5 % de O_2/CO_2 .

Preparación de fármacos

Se usaron los siguientes fármacos: acetilcolina, histamina, salbutamol, papaverina e indometacina. Todas las sustancias se obtuvieron de Sigma-Aldrich (San Luis, EE.UU.). Los fármacos se disolvieron en agua destilada a excepción de la indometacina y la quinina, que se disolvieron en etanol y después se diluyeron en un tampón de KH. La cantidad máxima de etanol (0,02 %) no influyó en las respuestas tisulares aisladas (Freas et al., 1989; Hatake y Wakabayashi, 2000). El RPL554 fue proporcionado amablemente por Verona Pharma PLC, Londres, Reino Unido. Los compuestos se almacenaron en pequeñas alícuotas a -80 °C hasta su uso.

Medición de la tensión

Se colocaron bronquios humanos en baños de órganos que contenían solución de tampón de KH (37 °C) medicados con indometacina (5,0 µM), se burbujearon con 95 % de O₂/5 % de CO₂ y se suspendieron con tensión pasiva (0,5 - 1,0 g). Los anillos bronquiales se montaron en ganchos en los baños de órganos donde un gancho estaba unido con un hilo a una varilla estacionaria y el otro gancho estaba atado con hilo a un transductor de desplazamiento de fuerza isométrica. Se dejó que las vías respiratorias se equilibraran durante 90 minutos con cambios repetidos de la solución de tampón de KH medicado cada 10 min. Los cambios en la tensión isométrica se midieron con un transductor (Fort 10 WPI, Basile, Instruments, Italia) y la capacidad de respuesta del tejido se evaluó mediante acetilcolina (100 µM); cuando la respuesta alcanzó una meseta, los anillos se lavaron tres veces y se dejaron equilibrar durante 45 min.

*Estudio del diseño**15 Influencia de RPL554 sobre la estimulación por campo eléctrico*

Cada baño de órganos se equipó con dos electrodos de placa de platino (1 cm²) colocados junto al tejido (a 10 mm de separación) para la estimulación por campo eléctrico (ECM). Los experimentos se realizaron usando trenes de ECM de 10 Hz (pulso bifásico con una corriente constante de 10 V, 0,5 ms, 10 s), un pulso cada 5 minutos durante la primera hora y después a intervalos de 30 minutos durante las siguientes 5 horas por un estimulador de pulso de multiplexación 3165 (Ugo Basile, VA - Italia) (Binks et al., 2001). Después del inicio de los trenes de ECM, los tejidos se incubaron con RPL554 (10 o 100 µM) hasta que se consiguió la inhibición máxima de la respuesta contráctil a la estimulación por campo eléctrico (ECM). Después terminó la incubación con el fármaco y los tejidos se lavaron repetidamente durante un periodo de 30 min y después una vez cada 30 min hasta 5 h después de la administración de los fármacos.

Efecto relajante de RPL554 sobre bronquios sensibilizados pasivamente

Se centrifugaron anillos bronquiales humanos aislados durante la noche a temperatura ambiente en tubos que contenían solución tampón de KH en ausencia (anillos de control no sensibilizados) o presencia de suero de sensibilización al 10 % en vol⁻¹ (anillos sensibilizados) como se describe en otra parte (Watson et al., 1997; Rabe, 1998). Sujetos que padecían asma atópica (IgE total > 250 U ml⁻¹ específico contra aeroalérgenos comunes) durante la exacerbación proporcionaron un consentimiento firmado para la donación de suero. Se prepararon sueros por centrifugación de sangre entera y las muestras de suero se congelaron a -80 °C en alícuotas de 200 ml hasta que se necesitaron.

A la mañana siguiente, después de la retirada de tejidos alveolares y conectivos adheridos, los anillos bronquiales se transfirieron a un baño de órganos que contenía tampón de KH (37 °C) y se gasificaron de forma continua con un 95 % de O₂/5 % de CO₂. Los tejidos se preincubaron durante 30 min con RPL554 (1, 10 y 100 µM) y seguido (sin lavado) de la construcción de la curva de respuestas a la concentración para la histamina (10 nM - 1 mM) en presencia de RPL554.

Efecto sinérgico de RPL554 más agonista del receptor adrenérgico β₂

Para someter a ensayo la posible relajación sinérgica inducida por RPL554 en combinación con un agonista del receptor adrenérgico β₂ (salbutamol), los anillos bronquiales se contrajeron con acetilcolina a la concentración requerida para provocar un 70 % de efecto máximo (EC70) y se les permitió un periodo de estabilización de 15 min. Después, se construyeron curvas de respuestas a la concentración para someter a ensayo el compuesto individual RPL554 y el agonista del receptor adrenérgico β₂ solo; así como RPL554 administrado en combinación con un agonista del receptor adrenérgico β₂ con el fin de producir gráficos isobolares como se describen en otra parte (Greco et al., 1995; Tallarida, 2001; Goldoni y Johansson, 2007; Boik et al., 2008; Lee, 2010).

Se usaron intervalos de 20 min entre las concentraciones sucesivas para alcanzar un nivel estable de relajación antes de la administración de la siguiente concentración. Tras la finalización del experimento, se añadió papaverina (500 µM) para relajar los tejidos completamente y proporcionar un patrón con el que se pudiera comparar cada tejido.

*Análisis de los resultados**60 Análisis de estudios de ECM*

Se midió la tensión contráctil bronquial inducida por ECM como porcentaje de los bronquios de control y se construyeron curvas polinómicas mediante el ajuste de modelos de datos biológicos usando regresión no lineal como se describe en otra parte (Motulsky y Christopoulos, 2004). El efecto máximo (Emáx) se identificó como la fuerza de contracción más baja inducida por estimulación ECM y el desplazamiento (t_{1/2}, min) indica el tiempo para evocar la mitad de la relajación máxima. Por cada tres anillos bronquiales montados en el sistema de baño de

órganos aislados, uno se utilizó como un control de tiempo como se describe en otra parte (Mercier et al., 2002).

Análisis de estudios de respuesta a la concentración

- 5 Se usó un ajuste de curva apropiado a un modelo sigmoidal para calcular el efecto (E), la Emáx y la concentración requerida para provocar un 50 % del efecto máximo (CE50). La ecuación utilizada fue $\log[\text{agonista}]$ frete a respuesta, pendiente variable, expresada como $Y = \text{Inferior} + (\text{Superior} - \text{Inferior}) / (1 + 10^{[(\log \text{CE50} - X) \cdot \text{Pendiente de Hill}]})$ (Motulsky y Christopoulos, 2004; Goodman et al., 2008). E/Emáx se expresó como el porcentaje de Emáx provocado por los agentes contráctiles; los valores de CE50 se convirtieron a pD₂ para el análisis estadístico (Goodman et al., 2008) y las respuestas relajantes se expresaron como porcentaje de relajación inducida por papaverina (500 µM).

Análisis de estudios de sinergia

- 15 El análisis de la sinergia potencial entre RPL554 más un agonista del receptor adrenérgico β₂ se midió mediante el método de Berenbaum, el criterio de Independencia de Bliss (IB) y el modelo aditividad de Loewe (AL) a través de isobolos curvados (Berenbaum, 1977; Greco et al., 1995; Grabovsky y Tallarida, 2004; Tallarida, 2006; Goldoni y Johansson, 2007; Tallarida y Raffa, 2010).
- 20 Con el fin de aplicar el método de Berenbaum, se evaluó el índice de interacción para los valores de CE50 y, por tanto, si el índice de interacción era <1 el efecto se consideró sinérgico; si el índice de interacción era >1 el efecto era antagónico y si el índice de interacción era = 0 el efecto se consideró aditivo (Goldoni y Johansson, 2007; Lee, 2010).
- 25 La teoría de IB para dos agentes se expresa mediante la siguiente ecuación: $E(x,y) = E_x + E_y - (E_x \cdot E_y)$, donde E es el efecto fraccionado, y x e y son las concentraciones de dos compuestos en un experimento de combinación. Si el efecto de combinación es superior al valor esperado de la ecuación anterior, la interacción se considera sinérgica, mientras que, si este efecto es inferior, la interacción es antagónica. De lo contrario, el efecto es aditivo y no hay interacción (Greco et al., 1995; Meletiadis et al., 2003; Boucher y Tam, 2006; Goldoni y Johansson, 2007; Boik et al., 2008; Lee, 2010). En este estudio, la ecuación de IB se caracterizó por X = RPL554 e Y = agonista del receptor adrenérgico β₂.

- Las curvas de respuesta a la concentración de control para salbutamol y RPL554 de bronquios de cada pulmón se ajustaron a una ecuación logística de 4 parámetros para calcular las estimaciones de los parámetros Emáx, pendiente (nH) y potencia (CE50). Las siguientes estimaciones de los parámetros Emáx y nH (media + DT) y CE50 (media geométrica, IC del 95 %) para salbutamol (78 + 11, 1,572 + 0,482, 0,283 (0,064 – 1,239) µM, n = 5, respectivamente) y RPL554 (100 ± 0, 2,271 ± 0,713, 21,2 (11,5 - 39,1) µM, n = 5, respectivamente) después se usaron para calcular la respuesta aditiva para la combinación de pares de fármacos para evaluar la sinergia (Tallarida y Raffa 2010) (Grabovsky y Tallarida 2004). Usando el concepto de equivalencia de la dosis, la relación $a/A + b/B = 1$ se reformuló como $b + \text{beq}(a) = B$, donde beq es la dosis equivalente de a y resolviendo para beq(a) igualando las dos curvas de respuesta a la concentración individuales $E_A = f(A)$ y $E_B = f(B)$. La respuesta aditiva (E_{ab}) para cada combinación de dosis con respecto a B después se calculó mediante la inserción de B en $E_B = f(B)$. La diferencia entre la respuesta de relajación observada a las dosis de combinación y la respuesta aditiva se calculó y analizó usando un ensayo t de una muestra y para comparaciones múltiples, la probabilidad se ajustó para comparaciones múltiples usando una corrección de Bonferroni. Con fines ilustrativos, las combinaciones de dosis 1:1 se analizaron para determinar la sinergia.

Análisis estadístico

- 50 Todos los valores se presentan como media ± ETM para cada grupo de tratamiento. La significación estadística se evaluó mediante el ensayo de t de Student o el análisis de la varianza (ANOVA) si es necesario y el nivel de significación estadística se definió como P<0,05 (Motulsky, 1995). Todos los análisis de datos se realizaron usando programas informáticos (GraphPad Prism, San Diego California EE.UU., Microsoft Excel, Redmond Washington, EE.UU.).

Efecto sinérgico de RPL554 administrado en combinación con salbutamol (un agonista del receptor adrenérgico β₂)

- Para someter a ensayo la relajación de la sinergia inducida por RPL554 administrado en combinación con salbutamol, los anillos bronquiales se contrajeron con acetilcolina a la concentración requerida para provocar un efecto máximo del 70 % (CE70) y se les permitió un periodo de estabilización de 15 min. Después, se construyeron curvas de respuesta a la concentración para someter a ensayo el compuesto individual RPL554 o salbutamol solos; o RPL554 administrado en combinación con salbutamol con el fin de producir gráficos isobolares (salbutamol:RPL554 y que varían de 10:1 a 1:100) como se describe en otra parte (Greco et al., 1995; Tallarida, 2001; Goldoni y Johansson, 2007; Boik et al., 2008; Lee, 2010).

Se usaron intervalos de 20 min entre concentraciones sucesivas para alcanzar un nivel estable de relajación antes de la administración de la siguiente concentración. Al finalizar el experimento, se añadió papaverina (500 μ M) para relajar los tejidos completamente y proporcionar un patrón con el que se pudiera comparar cada tejido.

5 Resultados

Características basales de los anillos bronquiales

10 No hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) entre las características basales de los anillos bronquiales humanos aislados empleados en el estudio con respecto al peso húmedo ($220,5 \pm 16,5$ mg), la contracción inducida por acetilcolina (100 μ M) (440 ± 95 mg) y la contracción inducida por ECM (10 Hz) antes de los tratamientos con fármacos (445 ± 98 mg).

15 En experimentos preliminares, se construyó una curva de respuesta a la concentración a acetilcolina (de 1 nM a 1 mM) para establecer una respuesta submáxima (respuesta máxima de aproximadamente el 70 %; 1250 ± 190 mg; $n = 5$) para estudios posteriores.

Influencia de RPL554 sobre el tono bronquial de las vías respiratorias humanas aisladas

20 RPL554 inhibió la respuesta contráctil inducida por ECM de los tejidos bronquiales humanos que se mantuvo durante al menos 5 h después de la exposición a este fármaco (Figura 1). RPL554 suprimió estas respuestas contráctiles a una concentración máxima de 100 μ M ($Emax$ $91,33 \pm 337$ %; $T_{1/2}$ $23,7 \pm 12,3$ min).

25 RPL554 provocó una relajación dependiente de la concentración de tejidos bronquiales humanos aislados precontraídos con acetilcolina. RPL554 fue menos potente ($P < 0,05$) que el salbutamol en la relajación bronquial, pero, en contraste con el salbutamol, RPL554 relajó completamente los tejidos ($P < 0,001$). Se ajustaron curvas de respuesta a la concentración para salbutamol y RPL554, a partir de bronquios de cada pulmón, a una ecuación logística de 4 parámetros para calcular estimaciones de los parámetros $Emax$, pendiente (nH) y potencia ($CE50$). Las siguientes estimaciones de los parámetros $Emax$ y nH (media $\pm$ DT) y $CE50$ (media geométrica, IC del 95 %) para salbutamol ($78 + 11$, $1,572 + 0,482$, $0,283$ ($0,064 - 1,239$) μ M, $n = 5$, respectivamente) y RPL554 (100 ± 0 , $2,271 \pm 0,713$, $21,2$ ($11,5 - 39,1$) μ M, $n = 5$, respectivamente) (Figura 2).

35 La sensibilización pasiva de los bronquios potenció el efecto contráctil de la histamina en comparación con tejidos no sensibilizados. En bronquios sensibilizados pasivamente, RPL554 a 1 y 10 μ M desplazó significativamente ($P < 0,001$) hacia la izquierda la curva de respuesta a la concentración de histamina en comparación con tejidos sin tratar y RPL554 en 100 μ M suprimió completamente la contracción inducida por histamina (Figura 3, Tabla 1).

Tabla 1: Efecto de RPL554 sobre la contracción inducida por histamina en bronquios sensibilizados pasivamente. Los datos mostrados son de experimentos realizados con muestras de sujetos diferentes $n = 5$ y se representan como media $\pm$ ETM *** $P < 0,001$ frente a control sensibilizado pasivamente.

	Sensibilizado pasivamente				
	No sensibilizado	Control	RPL554 1 μ M	RPL554 10 μ M	RPL554 100 μ M
$Emax$	$100,7 \pm 1,7$	$101,8 \pm 1,4$	$70,3 \pm 2,7$ ***	$58,1 \pm 2,2$ ***	nd
pD2	$4,82 \pm 0,03$ ***	$5,29 \pm 0,03$	$4,97 \pm 0,07$ ***	$4,98 \pm 0,07$ ***	nd

Efecto relajante sinérgico de RPL554 más salbutamol sobre el tono bronquial humano

45 El estudio de BI indica que la interacción de RPL554 más salbutamol indujo un efecto relajante sinérgico significativo para RPL554 a 1 y 10 μ M (ambos $P < 0,05$) en el tono bronquial humano precontraído con acetilcolina y se detectó el sinergismo máximo para RPL554 a 1 μ M más salbutamol a 100 nM (efecto delta de BI: $0,29 \pm 0,11$), aunque hubo una interacción sinérgica menos significativa entre salbutamol y RPL554 a concentraciones más bajas (10 nM y 100 nM, $P > 0,05$) (Figura 4). De hecho, el análisis de BI de la asociación isomolar (1:1) de RPL554 más salbutamol solo mostró una señal para sinergismo ($P = 0,08$) basada en la mejora de la potencia relajante (Tabla 2). Sin embargo, el análisis de Berenbaum demostró que RPL554 más salbutamol desencadenaron una interacción sinérgica para RPL554 en el intervalo de concentraciones de 10 nM a 10 μ M (Índice de Interacción: $0,25 \pm 0,06$) y que RPL554 provocó significativamente un desplazamiento hacia la izquierda de las curvas de concentración relajante-respuesta para salbutamol de $0,89 \pm 0,14$ logaritmos ($P < 0,05$).

	RPL554 + salbutamol	
	Observado	Esperado
$Emax$	$96,31 \pm 3,43$	$94,6 \pm 4,01$
pD2	$6,78 \pm 0,30$	$6,33 \pm 0,15$

**Delta de la potencia
(observada-esperada)**

0,45 ± 0,02 **

Tabla 2: Efecto sinérgico relajante de RPL554 más salbutamol (isomolar, 1:1) sobre la contracción submáxima inducida por acetilcolina. Los datos mostrados son de experimentos realizados con muestras de sujetos diferentes $n = 5$ y se representan como la media ± ETM. ** $P < 0,01$ para delta del efecto de la hipótesis de interacción cero (valores observados frente a esperados).

Por último, el análisis de la superficie 3D usando el método de IB demostró que el salbutamol indujo una interacción sinérgica extendida a través de las concentraciones cuando se administra en asociación con RPL554 (Figura 5). La respuesta de relajación observada y aditiva para las combinaciones de dosis 1:1 de sinergia de salbutamol y RPL554 se muestran en la Figura 6.

Se ha demostrado que la inhibición selectiva de PDE3/PDE4 por RPL554 desencadenó la relajación del tono bronquial en las vías respiratorias humanas aisladas que amplía y apoya observaciones notificadas previamente en la tráquea aislada de cobayas (Boswell-Smith et al., 2006b). Este efecto inhibidor se mantuvo durante hasta 5 h después de la terminación de la exposición al fármaco, lo que confirma la larga duración de acción de este compuesto en las vías respiratorias humanas. Por otra parte, RPL554 actuó para relajar las vías respiratorias contraídas ya sea con histamina o acetilcolina. Además, la incubación previa de tejidos con RPL554 dio como resultado una protección significativa de los tejidos frente a la acción contráctil de histamina administrada exógenamente en bronquios sensibilizados pasivamente. Además, la inhibición de PDE3/4 asociada a un agonista del receptor adrenérgico β_2 (salbutamol) demostró un efecto sinérgico sobre la relajación de ASM. Estos resultados muestran que RPL554 es un buen antagonista funcional contra agentes contráctiles en tejidos bronquiales humanos y cuando se combina con un agonista del receptor adrenérgico β_2 puede tener la capacidad de proporcionar broncodilatación sinérgica adicional.

RPL554 provocó una inhibición dependiente de la concentración y el tiempo de las respuestas contráctiles provocados por ECM, que tuvo una duración de acción considerablemente más larga contra las respuestas contráctiles inducidas por ECM que otros inhibidores de PDE4 (Spina et al., 1998; Boswell-Smith et al., 2006b.).

RPL554 fue particularmente eficaz en la inhibición de la respuesta contráctil en los bronquios humanos sensibilizados pasivamente contraídos con histamina y se ha notificado que una diversidad de inhibidores selectivos de PDE3 y PDE4 atenúan significativamente el broncoespasmo agudo inducida por antígeno en cobayas sensibilizadas (Boswell-Smith et al., 2006a).

RPL554 también indujo una disminución notable en la respuesta máxima a la histamina en los bronquios sensibilizados pasivamente.

Estudio de seguridad de la combinación de la presente invención

Este estudio se realizó para determinar si RPL554 tiene interacciones cardiovasculares con un agonista del receptor adrenérgico β_2 (salbutamol). Se incluyó un antagonista muscarínico (atropina) para completar. RPL554 es un inhibidor dual de PDE3/PDE4 que se está desarrollando para el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y el asma como un broncodilatador inhalado con posibles acciones antiinflamatorias. Las respuestas cardiovasculares a RPL554, salbutamol y salbutamol, proporcionados en forma de inyección intravenosa en bolo, se evaluaron como cambios cardiovasculares, medidos como cambios post-inyección máximos en la presión arterial y el ritmo cardíaco. El diseño del estudio fue ciego y aleatorio administrando los fármacos en pares separados por cinco minutos de forma alterna, por ejemplo, RPL554 seguido de salbutamol y viceversa. Las dosis elegidas para el estudio produjeron efectos cardiovasculares y, presumiblemente, concentraciones plasmáticas, mucho más altas que las utilizadas para la inhalación. En su lugar, se eligieron para someter a ensayo posibles interacciones en condiciones superiores a las terapéuticas.

Resumen

En este estudio, los efectos de RPL554, salbutamol y salbutamol, administrados por vía intravenosa, solos y en combinaciones, se examinaron de acuerdo con un diseño aleatorio, sobre la presión arterial y la frecuencia cardíaca en ratas anestesiadas. Se eligieron dosis que produjeran un aumento de 15-30 mmHg en la presión arterial media (PAM) y un aumento de la frecuencia cardíaca (FC) de 30-60 latidos por minuto, a partir de un estudio de dosis-respuesta inicial para RPL554 y salbutamol. Para el salbutamol, que produjo efectos menores sobre la presión arterial o la frecuencia cardíaca, la dosis máxima administrada se eligió para su estudio adicional. Después de ello, las dosis elegidas se examinaron en pares administrados con 5 minutos de diferencia. Los datos del estudio indican que no hubo interacción en términos cardiovasculares entre RPL554 y salbutamol o entre RPL554 y salbutamol en términos de efectos sobre la PAM o la FC en ratas anestesiadas. Con el fin de someter a ensayo rigurosamente posibles interacciones, las dosis y la vía de administración elegidas para el estudio produjeron efectos cardiovasculares no observados con las dosis terapéuticas habituales. Además, la vía intravenosa en bolo, presumiblemente dio como resultado concentraciones plasmáticas mucho más altas que las que no se ven con las

dosis terapéuticas más bajas administradas por inhalación. La intención del estudio fue usar condiciones superiores a las normales con el fin de cuestionar posibles interacciones en condiciones superiores a las terapéuticas.

Protocolo

Los estudios se realizaron en ratas macho Sprague-Dawley de Charles River de 200-250 g de peso. Una vez que las ratas se hubieron entregado al laboratorio experimental no tuvieron acceso a comida ni agua durante 1-3 horas. Para los fines del experimento los animales se anestesiaron con tiobutabarbitol a una dosis de 100 mg/kg administrada por vía i.p. No hubo necesidad de anestesia suplementaria y al final del periodo experimental se sacrificó cada rata. El estudio tenía dos partes: (I) un estudio de variación de dosis inicial y (II) el estudio de interacción. Los fármacos estudiados fueron: RPL554 (R), salbutamol (S), salbutamol (A) todos disueltos en solución salina.

(I) Estudio de variación de dosis inicial

Se realizó un estudio de intervalo de dosis inicial como se indica a continuación: se realizaron curvas de dosis-respuesta acumulativas para las dosis intravenosas en bolo de los tres fármacos para determinar las dosis apropiadas de cada uno de los tres fármacos para el estudio completo. Se eligieron dosis de RPL554 o salbutamol que produjeron un aumento de 15-30 mmHg en la presión arterial media (PAM) y un aumento de la frecuencia cardíaca (FC) de 30-60 latidos por minuto a partir de este estudio inicial de dosis-respuesta. La salbutamol produjo efectos cardiovasculares limitados por lo que se eligió una dosis alta ya que es una para la cual existe evidencia bibliográfica de bloqueo profundo de receptores muscarínicos. Este estudio de variación de dosis implicó cuatro ratas a las que se les administraron dosis acumulativas de cada uno de los 3 fármacos duplicando la dosis. Las dosis de cada uno de los fármacos se administraron como inyecciones en bolo i.v. cada 5 minutos con 1 hora entre diferentes fármacos. El orden de las inyecciones fue: para el animal 1 - S, R, A; animal 2 - R, A, S; animal 3 - A, S, R y animal 4 - R, A, S. Como se ha indicado anteriormente las dosis y vías de inyección se eligieron ya que producen efectos de dosis mayores a las normales y superiores que cuando se administran por inhalación.

De este estudio se eligieron las siguientes dosis para el estudio de interacción posterior:

R = 8 µg/kg - 8 µg/ml en solución salina al 0,9 %

S = 2 µg/kg - 2 µg/ml en solución salina al 0,9 %

A = 32 µg/kg - 32 µg/ml en solución salina al 0,9 %

(II) Estudio de interacción

En este estudio, todos los fármacos se administraron como una dosis única por inyección en bolo i.v., a través de una cánula en la vena yugular y en un volumen de 1 ml/kg. El diseño del estudio fue ciego y aleatorio con tres líneas conteniendo cada una cuatro animales para un total de 12 animales.

Se administraron pares de fármacos a animales individuales de forma ciega aleatorizada usando un diseño de línea por línea donde cada línea contenía cuatro ratas con inyecciones como se indican a continuación: R1S2, S1R2, R1A2 y A1R2 (en orden aleatorio, donde 1 indica el primer fármaco administrado y 2 indica el segundo fármaco administrado 5 minutos después del primer fármaco). Se estudiaron 3 líneas en total, por tanto, se utilizaron 12 ratas en total y no hubo que reemplazar ninguno de los animales. El estudio se detuvo después de 12 animales con el propósito de realizar un análisis provisional para determinar si se justificaba el estudio adicional y, si era así, si eran necesarias más líneas y/o ajustes de dosis (un diseño adaptativo).

La presión arterial se midió en una arteria carótida usando un transductor cuyos resultados se procesaron mediante AD Instruments 26T PowerLab. La frecuencia cardíaca se calculó latido a latido a partir de los gráficos de ECG y presión arterial. El análisis se hizo mediante LabChart 6. Las mediciones se hicieron usando las funciones de LabChart 6.

Todos los efectos de los fármacos se midieron en el momento de la respuesta máxima de cada inyección de fármaco. El tiempo hasta la respuesta máxima con salbutamol fue de aproximadamente 20 segundos para la presión arterial y 60 segundos para la frecuencia cardíaca. Para RPL554 los tiempos correspondientes fueron 60-80 segundos para la presión arterial y 2-4,5 minutos para la frecuencia cardíaca. Para salbutamol, fue de 4 minutos, tanto para la presión arterial como para la frecuencia cardíaca.

Los datos se registraron como presión arterial sistólica, diastólica y media calculada en mmHg mientras que la frecuencia cardíaca se registró como latidos/min. Los valores registrados se procesaron para proporcionar cambios inducidos por fármacos en la presión arterial y la frecuencia cardíaca a partir de dos valores de control. Uno de ellos fue anterior a la primera inyección y el segundo anterior a la segunda inyección. Los cambios calculados también se normalizaron a estos dos valores de control y se expresaron ya sea como un valor negativo para una disminución

desde los valores de control o como un valor positivo para un aumento desde los valores de control.

Resultados

5 Farmacodinamia primaria

Tabla 3. Efectos de RPL554, salbutamol y atropina, solos y después de otro fármaco, sobre cambios a partir de la presión arterial media y la frecuencia cardíaca media de control (Δ) en ratas anestesiadas (n = 3 para cada valor medio)

Efecto de RPL554 cuando se combina con salbutamol o atropina				
	Δ PAM (mmHg y %)		Δ FC (lpm y %)	
RPL554 antes del salbutamol *	-15	-15 %	36	10 %
RPL554 después del salbutamol **	-17	-16 %	29	7 %
RPL554 antes de la atropina *	-17	-16 %	30	8 %
RPL554 después de la atropina **	-19	-20 %	33	10 %
Efecto del salbutamol cuando se combina con RPL554				
	Δ PAM (mmHg y %)		Δ FC (lpm y %)	
Salbutamol antes RPL554 *	-32	-30 %	58	18 %
Salbutamol después de RPL554 ***	-23	-24 %	43	11 %
Efecto de la atropina cuando se combina con RPL554				
	Δ PAM (mmHg y %)		Δ FC (lpm y %)	
Atropina antes de RPL554 *	-5,0	-5 %	6,3	1 %
Atropina después de RPL554 ****	-2,7	-3 %	21	5 %

Los fármacos se administraron como inyecciones en bolo i.v. por pares con 5 minutos de diferencia. Los valores Δ son la diferencia en los efectos máximos a partir del valor anterior al fármaco, expresada como cambio o porcentaje de cambio con respecto a valores anteriores al fármaco.

* = respuesta de control al fármaco sin tratamiento farmacéutico previo

Las variables farmacodinámicas primarias medidas fueron la presión arterial sistólica y diastólica con la presión arterial media computarizada y la frecuencia cardíaca. El resumen de los cambios observados se muestra en la Tabla 3 anterior.

Como puede observarse en todos los casos, a la dosis estudiada, RPL554 produjo una disminución en la presión arterial, independientemente de si las presiones sistólica, diastólica o media se expresaron como cambios reales o se normalizaron para valores anteriores al fármaco. Cuando se midieron antes o después de la administración previa de salbutamol o salbutamol, los cambios en la presión arterial para la inyección de RPL554 no fueron diferentes, como puede observarse en la Tabla 3, ya fuera que los cambios se expresaran como cambios con respecto a antes del fármaco o se normalizaran como un porcentaje.

Las respuestas de la frecuencia cardíaca, de forma similar, no se vieron influenciadas por la administración previa de los otros fármacos, aunque la administración del segundo fármaco 5 minutos después del primero sí cambió los valores anteriores al fármaco de una manera dependiente del fármaco considerado.

30 Farmacodinamia secundaria y farmacología de seguridad

Las variables farmacodinámicas secundarias fueron: ECG, frecuencia respiratoria y arritmias. No se observaron cambios significativos en el ECG o la frecuencia respiratoria y no se observaron arritmias.

35 Interacciones de fármacos farmacodinámicas

Las posibles interacciones cardiovasculares entre los tres fármacos fueron el objetivo primario del estudio. No se observaron interacciones importantes entre los fármacos como se presenta en la Tabla 3 ni se vieron mediante inspección de los registros experimentales reales.

Ejemplo 2

Efecto sinérgico in vivo de RPL554 administrado en combinación con salbutamol (un agonista del receptor adrenérgico β_2)

Este ejemplo investiga la capacidad de RPL554 para revertir la broncoconstricción inducida por bombesina y los posibles efectos sinérgicos cuando RPL554 se administra en combinación con salbutamol.

Se anestesiaron y se ventilaron cobayas. Se indujo la obstrucción de las vías respiratorias mediante la administración intravenosa de bombesina (2 µg/ml; 5 ml/h). Se indujo broncodilatación mediante la administración i.v. de RPL554 solo a diversas dosis o en combinación con una dosis submáxima de salbutamol (20 µg/kg). Se seleccionaron las dosis después de estudios de generación de una curva de dosis-respuesta para el salbutamol para seleccionar una dosis dando como resultado una reducción de aproximadamente el 20 % en la obstrucción de las vías respiratorias. Se midieron la resistencia pulmonar total (R_p) y la presión arterial media. Los datos se expresaron como % de reducción en la obstrucción de las vías respiratorias o la presión arterial.

RPL554 provocó una relajación dependiente de la dosis de las vías respiratorias de cobayas a partir de 10-80 µg/kg. En combinación con salbutamol 20 µg/kg (una dosis que provocó una reducción del $34,2 \pm 11,1$ % en la obstrucción de las vías respiratorias), RPL554 también dio como resultado una mayor relajación de las vías respiratorias (Tabla 4). La administración i.v. (que no era posible cuando se coadministró con cualquiera de los dos) de RPL554 20 µg/kg provocó una reducción de la presión arterial media (control: $37,3 \pm 6,7$ %, + salbutamol 20 µg/kg: $23,3 \pm 13,0$ %).

Tabla 4	% de Reducción de la obstrucción de las vías respiratorias	
	Control de RPL554	RPL554 + salbutamol (20 µg/kg)
10 µg/kg	$7,4 \pm 1,9$	$63,7 \pm 22,4$
20 µg/kg	$24,6 \pm 4,3$	$66,0 \pm 12,9$
40 µg/kg	$55,2 \pm 6,2$	$76,3 \pm 17,4$
80 µg/kg	$65,1 \pm 5,3$	$77,6 \pm 6,3$

Los resultados proporcionan evidencia adicional de que RPL554 es un broncodilatador eficaz que, cuando se combina con el agonista del receptor adrenérgico β_2 salbutamol, tiene actividades sinérgicas como broncodilatador, pero no interactúa con las clases de fármacos sobre la presión arterial.

Ejemplo 3

Efecto sinérgico de RPL554 administrado en combinación con salmeterol (un agonista del receptor adrenérgico β_2)

El método del Ejemplo 1 para evaluar el efecto sinérgico de la combinación de RPL554 y salbutamol se repite para el agonista del receptor adrenérgico β_2 salmeterol. Se construyen curvas de respuesta a la concentración para someter a ensayo RPL554 solo, salmeterol solo y RPL554 administrado en combinación con salmeterol. Se usan el Método de Berenbaum y los criterios de Independencia de Bliss para evaluar la acción sinérgica entre el salmeterol y RPL554. Se observa un efecto sinérgico para la combinación de RPL554 y salmeterol.

Ejemplo 4

Efecto sinérgico de RPL554 administrado en combinación con formoterol (un agonista del receptor adrenérgico β_2)

El método del Ejemplo 1 para evaluar el efecto sinérgico de la combinación de RPL554 y salbutamol se repite para el agonista del receptor adrenérgico β_2 formoterol. Se construyen curvas de respuesta a la concentración para someter a ensayo RPL554 solo, formoterol solo y RPL554 administrado en combinación con formoterol. Se usan el Método de Berenbaum y los criterios de Independencia de Bliss para evaluar la acción sinérgica entre el formoterol y RPL554. Se observa un efecto sinérgico para la combinación de RPL554 y formoterol.

Ejemplo 5

Efecto sinérgico de RPL554 administrado en combinación con pirbuterol (un agonista del receptor adrenérgico β_2)

El método del Ejemplo 1 para evaluar el efecto sinérgico de la combinación de RPL554 y salbutamol se repite para el agonista del receptor adrenérgico β_2 pirbuterol. Se construyen curvas de respuesta a la concentración para someter a ensayo RPL554 solo, pirbuterol solo y RPL554 administrado en combinación con pirbuterol. Se usan el Método de Berenbaum y los criterios de Independencia de Bliss para evaluar la acción sinérgica entre el pirbuterol y RPL554. Se observa un efecto sinérgico para la combinación de RPL554 y pirbuterol.

Ejemplo de formulación 1 - administración mediante un IPS

Se microniza una combinación de RPL554 (0,2 mg) y después se mezcla con la lactosa (25 mg). Esta mezcla combinada se carga entonces en un cartucho de inhalación de gelatina. El contenido del cartucho se administra usando un IPS, por ejemplo.

Se mezcla una combinación de RPL554 micronizado (100 mg) con lactosa molida (25 g) (por ejemplo, lactosa en la que no más de aproximadamente el 85 % de las partículas tiene una MDM de aproximadamente 60 µm a aproximadamente 90 µm y no menos del 15 % de las partículas tiene una MDM de menos de 15 µm). La mezcla

combinada después se carga en alveolos individuales de blíster desprendible en una cantidad suficiente para proporcionar aproximadamente 10-500 µg de la combinación de RPL554 por dosis. El contenido de los alveolos se administra usando un IPS.

- 5 Como alternativa, se mezcla una combinación RPL554 micronizado (1 g) con lactosa molida (200 g) para formar una composición a granel que tiene una relación de peso de compuesto con respecto a lactosa molida de 1:200. La composición mezclada se envasa en un IPS capaz de entregar aproximadamente 10-500 µg del RPL554 por dosis.

- 10 Como alternativa, se mezclan un RPL554 micronizado (100 mg) y un agonista del receptor adrenérgico β_2 micronizado (500 mg) con lactosa molida (30 g). La mezcla combinada después se carga en alveolos individuales de un blíster desprendible en una cantidad suficiente para proporcionar de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 500 µg de la dosis de RPL554. El contenido de los alveolos se administra usando un IPS.

Ejemplo de formulación 2 - composiciones para su uso en un IDD

- 15 Una combinación de RPL554 micronizado (10 g) se dispersa en una solución preparada disolviendo lecitina (0,2 g) en agua desmineralizada (200 ml). La suspensión resultante se seca por pulverización y después se microniza para formar una composición micronizada que comprende partículas que tienen un diámetro medio de menos de aproximadamente 1,5 µm. La composición micronizada después se carga en cartuchos de IDD que contienen
- 20 1,1,1,2-tetrafluoroetano presurizado en una cantidad suficiente para proporcionar de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 500 µg del RPL554 por dosis cuando se administra mediante el IDD.

- 25 Como alternativa, una suspensión que contiene combinación de RPL554 al 5 % en peso, lecitina al 0,5 % en peso y trehalosa al 0,5 % en peso se prepara dispersando 5 g de una combinación de RPL554 como partículas micronizadas con un tamaño medio de menos de 10 µm en una solución coloidal formada a partir de 0,5 g de trehalosa y 0,5 g de lecitina disueltos en 100 ml de agua desmineralizada. La suspensión se seca por pulverización y el material resultante se microniza a partículas que tienen un diámetro medio inferior a 1,5 µm. Las partículas se cargan en botes con 1,1,1,2-tetrafluoroetano presurizado.

- 30 **Ejemplo de formulación 3 - composición para su uso en un inhalador nebulizador**

- Se disuelve una combinación de RPL554 (25 mg) en solución salina isotónica (125 ml) tamponada con citrato (pH 5). La mezcla se agita y se somete a ultrasonidos hasta que se disuelve el compuesto. El pH de la solución se comprueba y se ajusta, si es necesario, a pH 5 mediante adición lenta de hidróxido de sodio 1 N acuoso. La solución
- 35 se administra mediante un dispositivo nebulizador que proporciona de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 500 µg de RPL554 por dosis.

Ejemplo de formulación 4 - cápsulas de gelatina dura para la administración oral

- 40 Se mezclan homogéneamente una combinación de RPL554 (50 g), lactosa secada por pulverización (440 g) y estearato de magnesio (10 g). La composición resultante después se carga en cápsulas de gelatina dura (500 mg de composición por cápsula).

Ejemplo de Formulación 5 - suspensión para administración por vía oral

- 45 Los siguientes ingredientes se mezclan para formar una suspensión que contiene 100 mg de compuesto por 10 ml de suspensión:

Ingredientes	Cantidad
Combinación de RPL554	1,0 g
Ácido fumárico	0,5 g
Cloruro de sodio	2,0 g
Metil parabeno	0,15 g
Propil parabeno	0,05 g
Azúcar granulado	25,5 g
Sorbitol (solución al 70 %)	12,85 g
Veegum ^{RTM} K (silicato de magnesio y aluminio)	1,0 g
Aromatizante	0,035 ml
Colorantes	0,5 mg
Agua destilada	c.s.p. 100 ml

- 50 **Ejemplo de formulación 5 - formulación inyectable para la administración por inyección**

Se mezcla una combinación de RPL554 (0,2 g) con solución de tampón de acetato de sodio 0,4 M (2,0 ml). El pH de

la solución resultante se ajusta a pH 4 usando ácido clorhídrico acuoso 0,5 N o hidróxido de sodio acuoso 0,5 N, según sea necesario, y después se añade agua suficiente para inyección para proporcionar un volumen total de 20 ml. Después, la mezcla se filtra a través de un filtro estéril (0,22 micrómetros) para proporcionar una solución estéril adecuada para la administración por inyección.

REFERENCIAS

Berenbaum MC (1977) *Synergy, additivism and antagonism in immunosuppression. A critical review. Clin Exp Immunol* 28: 1-18.

Binks AP, Paydarfar D, Schachter SC, Guz A y Banzett RB (2001) *High strength stimulation of the vagus nerve in awake humans: a lack of cardiorespiratory effects. Respir Physiol* 127: 125-133.

Boik JC, Newman RA y Boik RJ (2008) *Quantifying synergism/antagonism using nonlinear mixed-effects modeling: a simulation study. Stat Med* 27: 1040-1061.

Boswell-Smith V, Cazzola M y Page CP (2006a) *Are phosphodiesterase 4 inhibitors just more theophylline? J Allergy Clin Immunol* 117: 1237-1243.

Boswell-Smith V, Spina D, Oxford AW, Comer MB, Seeds EA y Page CP (2006b) *The pharmacology of two novel long-acting phosphodiesterase 3/4 inhibitors, RPL554 [9,10-dimethoxy-2(2,4,6-trimethylphenylimino)-3-(n-carbamoyl-2-aminoethyl)-3,4,6,7-tetrahydro-2H-pyrimido[6,1-a]isoquinolin-4-one] and RPL565 [6,7-dihydro-2-(2,6-diisopropylphenoxy)-9,10-dimethoxy-4H-pyrimido[6,1-a]isoquinolin-4-one]. J Pharmacol Exp Ther* 318: 840-848.

Boucher AN y Tam VH (2006) *Mathematical formulation of additivity for antimicrobial agents. Diagn Microbiol Infect Dis* 55: 319-325.

Freas W, Hart JL, Golightly D, McClure H y Muldoon SM (1989) *Contractile properties of isolated vascular smooth muscle after photoradiation. Am J Physiol* 256: H655-664.

Goldoni M y Johansson C (2007) *A mathematical approach to study combined effects of toxicants in vitro: evaluation of the Bliss independence criterion and the Loewe additivity model. Toxicol In Vitro* 21: 759-769.

Goodman LS, Gilman A y Brunton LL (2008) *Goodman & Gilman's manual of pharmacology and therapeutics. McGraw-Hill Medical, Nueva York.*

Grabovsky Y y Tallarida RJ (2004) *Isobolographic analysis for combinations of a full and partial agonist: curved isoboles. J Pharmacol Exp Ther* 310: 981-986.

Greco WR, Bravo G y Parsons JC (1995) *The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. Pharmacol Rev* 47: 331-385.

Hatake K y Wakabayashi I (2000) *Ethanol suppresses L-arginine-induced relaxation response of rat aorta stimulated with bacterial lipopolysaccharide. Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi* 35: 61-68.

Meletiadiis J, Mouton JW, Meis JF y Verweij PE (2003) *In vitro drug interaction modeling of combinations of azoles with terbinafine against clinical Scedosporium prolificans isolates. Antimicrob Agents Chemother* 47: 106-117.

Mercier FJ, Naline E, Bardou M, Georges O, Denjean A, Benhamou D y Advenier C (2002) *Relaxation of proximal and distal isolated human bronchi by halothane, isoflurane and desflurane. Eur Respir J* 20: 286-292.

Motulsky H (1995) *Intuitive biostatistics. Oxford University Press, Nueva York; Oxford.*

Motulsky H y Christopoulos A (2004) *Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression: a practical guide to curve fitting. Oxford University Press, Oxford.*

Rabe KF (1998) *Mechanisms of immune sensitization of human bronchus. Am J Respir Crit Care Med* 158: S161-170.

Spina D, Ferlenga P, Biasini I, Moriggi E, Marchini F, Semeraro C y Page CP (1998) *The effect duration of selective phosphodiesterase inhibitors in the guinea pig. Life Sci* 62: 953-965.

Tallarida RJ (2001) *Drug synergism: its detection and applications. J Pharmacol Exp Ther* 298: 865-872.

Tallarida RJ (2006) *An overview of drug combination analysis with isobolograms. J Pharmacol Exp Ther* 319: 1-7.

Tallarida RJ y Raffa RB (2010) *The application of drug dose equivalence in the quantitative analysis of receptor occupation and drug combinations*. *Pharmacol Ther* 127: 165-174.

- 5 Watson N, Bodtke K, Coleman RA, Dent G, Morton BE, Ruhlmann E, Magnussen H y Rabe KF (1997) *Role of IgE in hyperresponsiveness induced by passive sensitization of human airways*. *Am J Respir Crit Care Med* 155: 839-844.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:
(a) un inhibidor de PDE3/PDE4 que es 9,10-dimetoxi-2-(2,4,6-trimetilfenilimino)-3-(N-carbamoil-2-aminoetil)-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirimido[6,1-a]isoquinolin-4-ona o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de la misma; y
(b) un agonista del receptor adrenérgico β_2 que es salbutamol, albuterol, bitolterol, fenoterol, formoterol, isoetarina, levalbuterol, metaproterenol, pirbuterol, salmefamol, salmeterol o terbutalina,
composición que es para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección que es asma, asma alérgica, fiebre del heno, rinitis alérgica, bronquitis, enfisema, bronquiectasia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA), asma resistente a esteroides, asma severa, asma pediátrica, fibrosis quística, fibrosis de los pulmones, fibrosis pulmonar, enfermedad pulmonar intersticial, trastornos de la piel, dermatitis atópica, psoriasis, inflamación ocular, isquemia cerebral o una enfermedad autoinmunitaria.
2. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la enfermedad o afección es asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).
3. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el inhibidor de PDE3/PDE4 (a) es 9,10-dimetoxi-2-(2,4,6-trimetilfenilimino)-3-(N-carbamoil-2-aminoetil)-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirimido[6,1-a]isoquinolin-4-ona.
4. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el agonista del receptor adrenérgico β_2 (b) es salbutamol, salmeterol, formoterol, albuterol o pirbuterol.
5. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición es una combinación fija.
6. Una composición farmacéutica que comprende una composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 5 y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente,
composición farmacéutica que es para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección como se define en la reivindicación 1 o 2.
7. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la composición farmacéutica es para su administración mediante inhalador de polvo seco (IPS) o inhalador de dosis medida (IDM).
8. Un inhibidor de PDE3/PDE4 como se define en la reivindicación 1 o 3 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección como se define en la reivindicación 1 o 2 en combinación con un agonista del receptor adrenérgico β_2 como se define en la reivindicación 1 o 4.
9. Un agonista del receptor adrenérgico β_2 como se define en la reivindicación 1 o 4 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección como se define en la reivindicación 1 o 2 en combinación con un inhibidor de PDE3/PDE4 como se define en la reivindicación 1 o 3.
10. Un producto que comprende (a) un inhibidor de PDE3/PDE4 como se define en la reivindicación 1 o 3 y (b) un agonista del receptor adrenérgico β_2 como se define en la reivindicación 1 o 4 para su uso simultáneo, por separado o secuencial en el tratamiento de una enfermedad o afección como se define en la reivindicación 1 o 2.

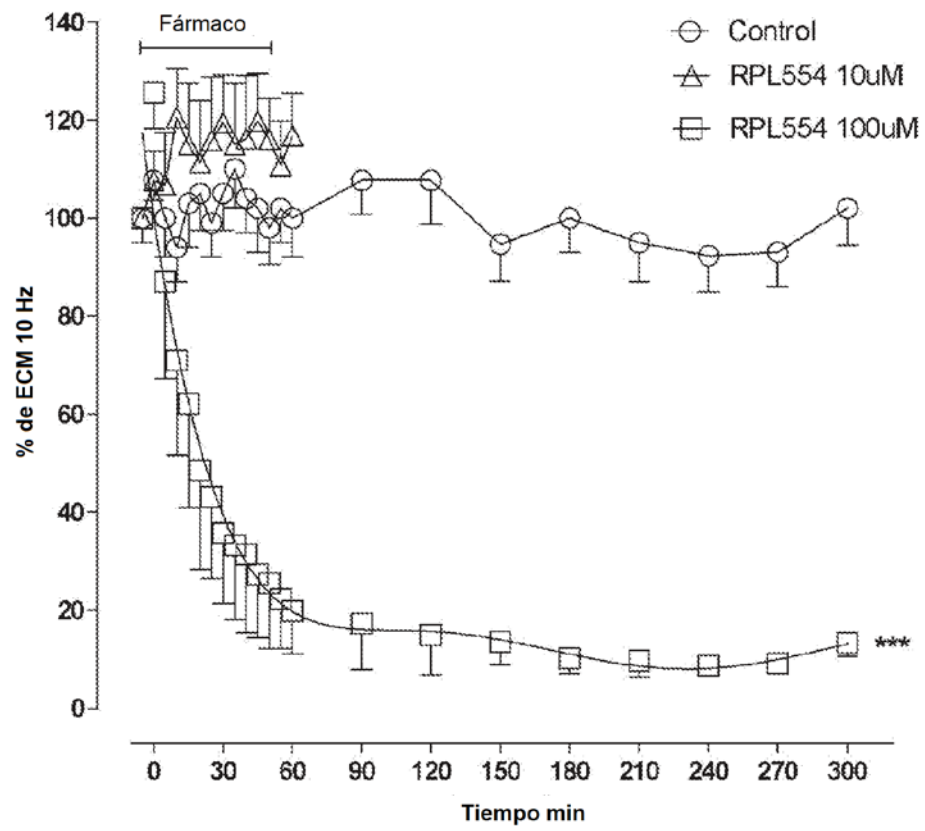


Figura 1

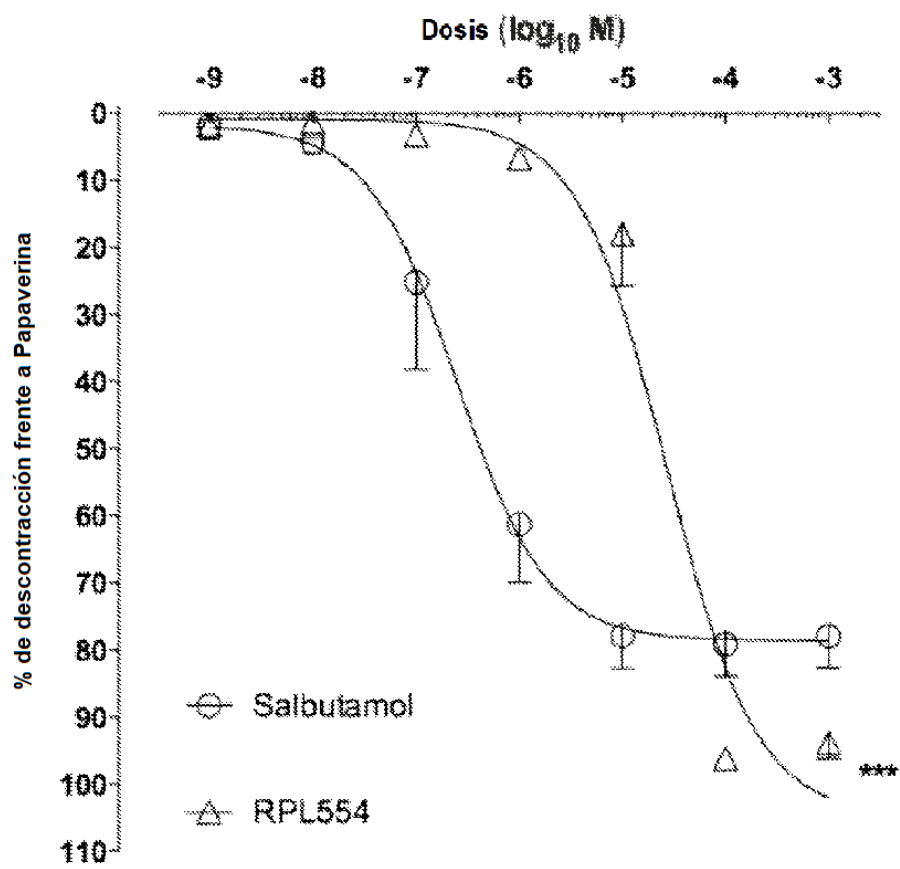


Figura 2

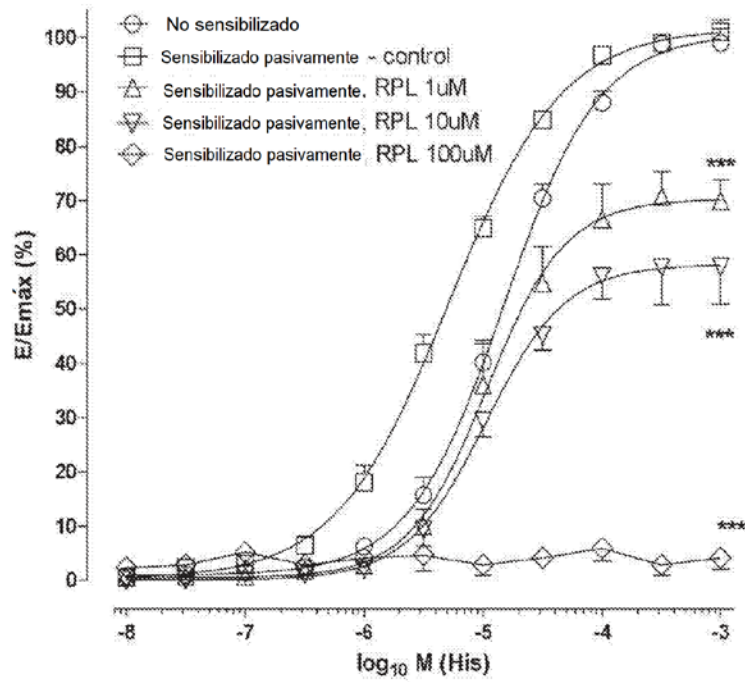


Figura 3

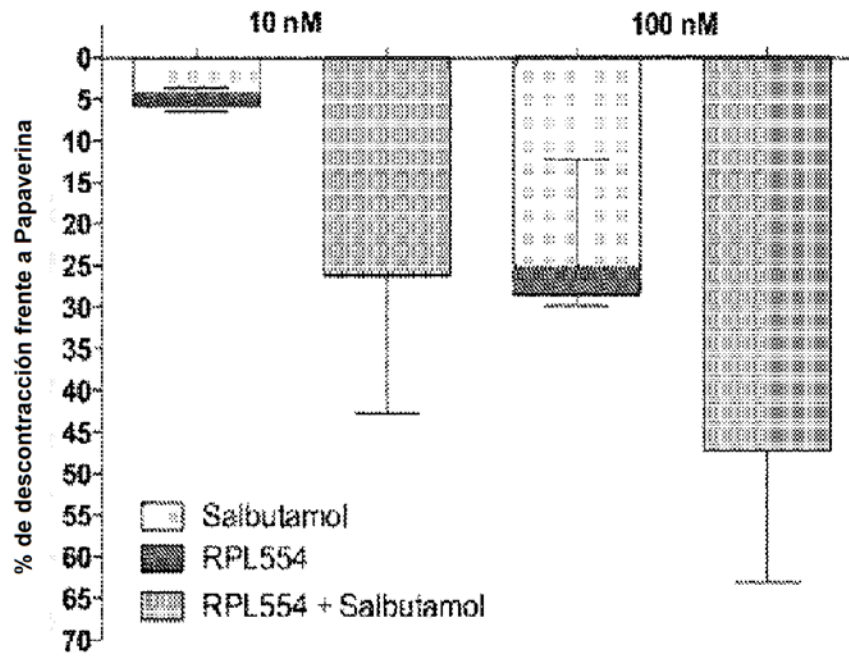


Figura 4

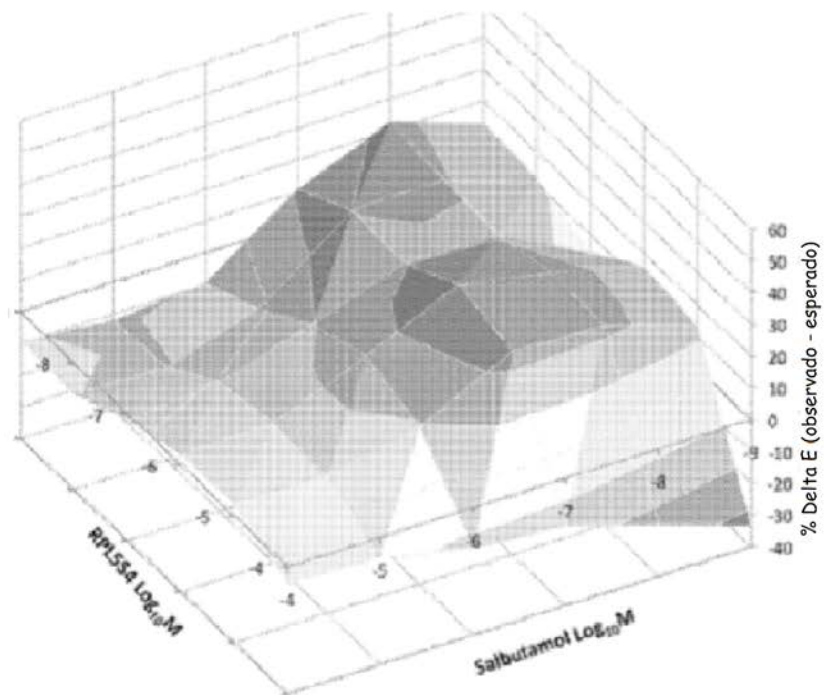


Figura 5

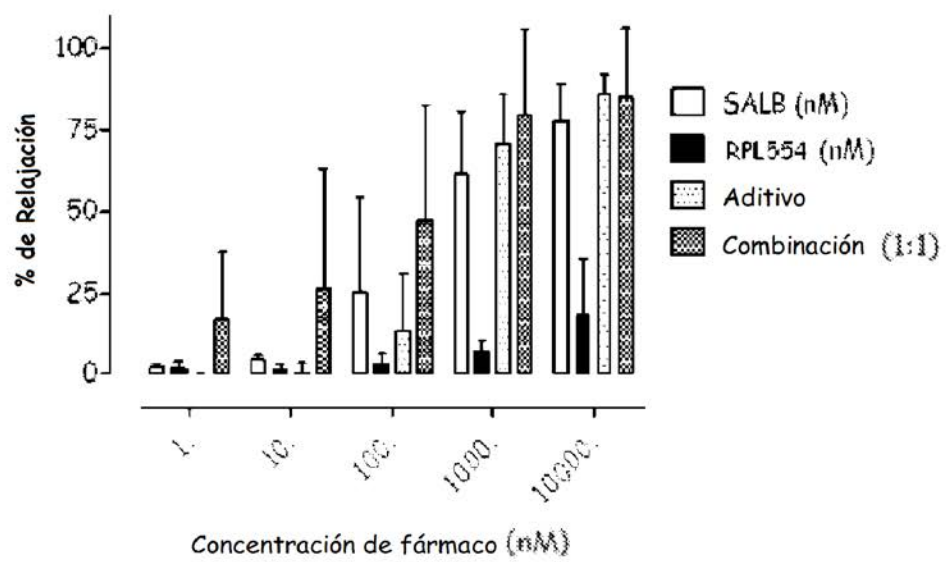
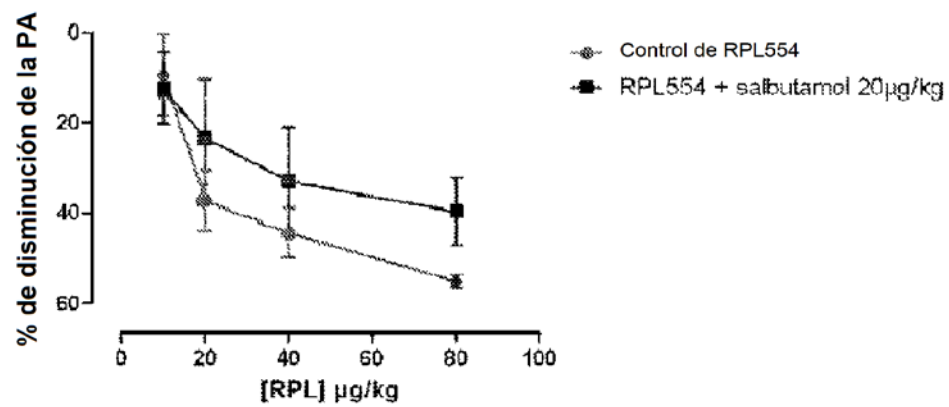
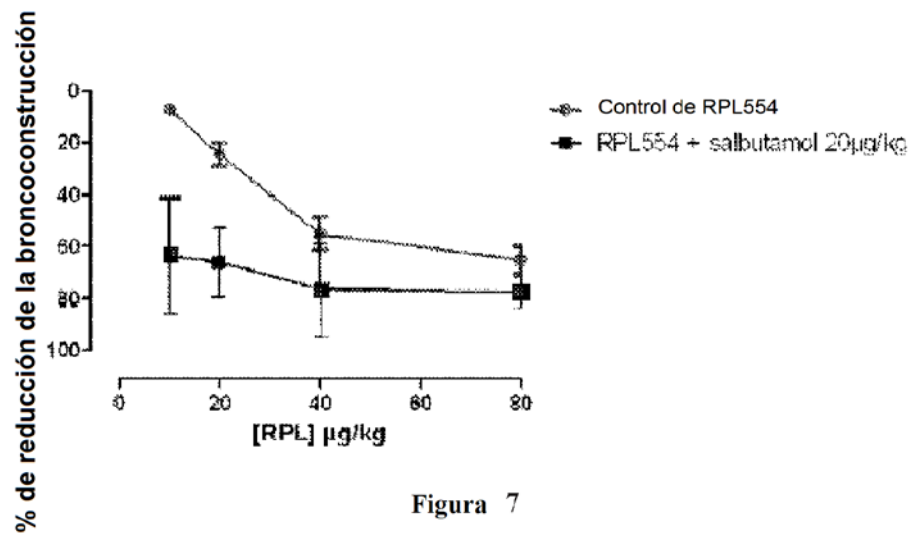


Figura 6



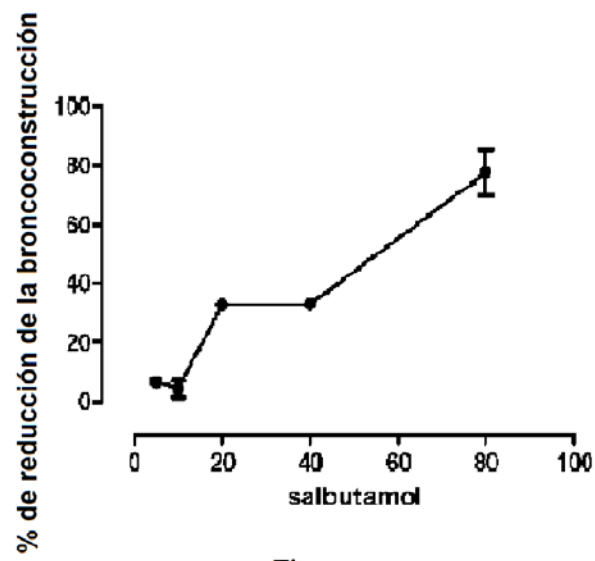


Figura 9

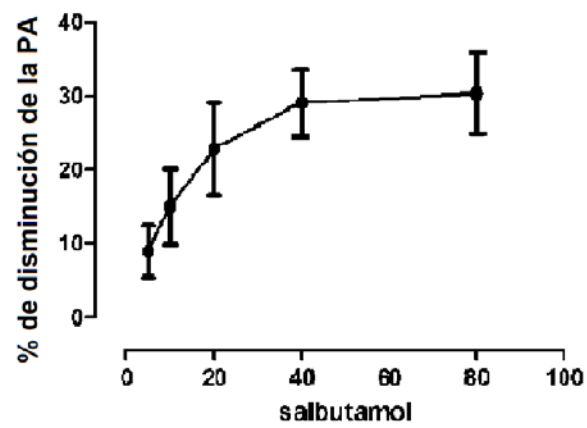


Figura 10